

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**MECANISMOS REGULADORES DE LAS CÉLULAS MADRE
NEURALES: IMPLICACIÓN EN LOS PROCESOS DE
ENVEJECIMIENTO Y CÁNCER**

Olatz Arrizabalaga Garde
Licenciada en Biotecnología

Directores de la tesis:
Dra. Rosario Perona Abellón
Dr. Ander Matheu Fernández

Madrid 2015



Por la presente, **Rosario Perona Abellón**, Doctora en Farmacia y Profesor de Investigación del CSIC en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Madrid, y **Ander Matheu Fernández**, Doctor en Bioquímica e Investigador IKERBASQUE contratado por el Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia, certifican que:

Dña. Olatz Arrizabalaga Garde, Licenciada en Biotecnología por la Universidad de León, ha realizado bajo nuestra dirección la Tesis Doctoral titulada:

“Mecanismos reguladores de las células madre neurales: implicación en los procesos de envejecimiento y cáncer” en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” y en el Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia.

Consideramos que la presente Tesis Doctoral reúne a nuestro juicio las condiciones de originalidad y rigor necesarios, y por lo tanto, se encuentra en condiciones de ser presentada y defendida públicamente para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste a todos los efectos, firmamos la presente autorización para la defensa de esta en Madrid a 30 de octubre del 2015.

Dra. Rosario Perona Abellón
Directora de la Tesis
Profesor de Investigación
CSIC

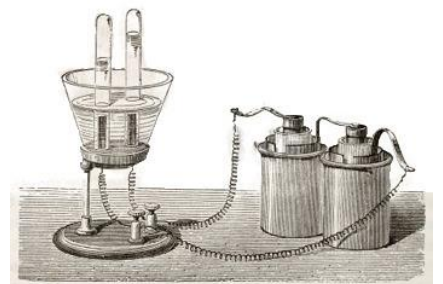
Dr. Ander Matheu Fernández
Director de la Tesis
Investigador contratado
IIS Biodonostia

*A mis padres,
A Jon,
A Iban*

*"Nadie puede hacerte
sentir inferior sin tu
consentimiento"*

E. Roosevelt

AGRADECIMIENTOS



La verdad, han sido muchas las personas que en diferentes circunstancias han pasado por mi camino a lo largo de estos años y a las que me gustaría dedicar unas palabras de agradecimiento. Espero no olvidarme de nadie.

Para empezar, quiero agradecerles a mis directores de tesis, a la Dra. Rosario Perona, gracias por darme la oportunidad de comenzar a trabajar y de realizar la tesis en el laboratorio 1.11, y sobre todo gracias por tu confianza y tu apoyo, al Dr. Ander Matheu, gracias también por darme la oportunidad de formar parte ese pequeño grupo lleno de grandes personas, gracias por todo lo que me has enseñado, tanto por los conocimientos científicos y por tu motivación ante el trabajo, como por la confianza depositada en mí. A ambos dos, muchas gracias.

Gracias al Dr. Cristóbal Belda porque fue la persona que me ayudó a empezar en todo esto y por tanto, responsable de que hoy haya llegado hasta aquí. Gracias también al Dr. Leandro Sastre por su disposición a ayudar y a responder cualquier duda.

Gracias a todos los que me acogisteis en el laboratorio 1.11 porque aunque muchos ya no estéis, creo que no hubiera habido mejor sitio para empezar una tesis. Gracias a Carmen, Cristina, Laura P. y Blanca por facilitarme la cosas y ayudarme a lo largo del tiempo que compartimos laboratorio. A Inma, por la motivación e ilusión que le pones a las cosas. A Jaime y Javi, los únicos dos hombres que tanto hacían reír a tanta mujer junta, cosa que no es nada fácil, además quiero agradecerle Javi el apoyo que me diste en muchos de los momentos vividos, espero que a tu hijo le enseñes bien y sea un poco más de la real que tú ☺. A Laura I., Maria G. y Olga, parte del grupo de batalla con el que tan buenos momentos pasé, gracias a las tres por el apoyo recibido y por brindarme vuestra amistad. A Andrea, que al llegar fuiste mi mayor apoyo y que de ti aprendí muchas cosas. Finalmente a Vane, Maria C. y Vero, de cada una de vosotras he aprendido cosas muy valiosas que me llevo y creo que en parte me han hecho poder llegar hasta este punto, fuisteis mi modelo a seguir durante mi comienzo y os agradezco los esfuerzos y tiempo que me habéis dedicado. En general, gracias por hacerme un hueco en vuestra pequeña familia, me hicisteis sentir más cerca de casa. Suerte y espero que todo os vaya muy bien.

También me gustaría agradecer a todo el personal de IIB su atención y su profesionalidad demostrada durante este tiempo.

Gracias al Dr. Ángel Ayuso y a su grupo, en especial a Noemí, que aunque no llegamos a compartir mucho tiempo en Madrid, años atrás compartimos desde piso hasta pupitre, y eso hace que también te quiera agradecer tu amistad y tu apoyo en los momentos más turbulentos. Estoy segura de que todo te ira genial.

No me quiero olvidar del tiempo que he pasado en el laboratorio de la Dra. Ana María Cuervo, donde he tenido el privilegio de poder trabajar junto a una de las personas más brillantes además de amables que he conocido. Tuve la suerte de haber sido acogida por grandes profesionales, gracias Eloy, Julio y Antonio por la apoyarme a lo largo de toda la estancia. Gracias también al Dr. Fernando Macian por su atención y la ayuda prestada.

Agradecimientos

Además de mi ciudad natal, Donosti también ha sido testigo de esta etapa que está a punto de finalizar, y aquí también he tenido la suerte de conocer a gente que por una cosa o por otra, en estos momentos han hecho que me acuerde de ellos y que creo que se merecen formar parte de este escrito.

Me gustaría agradecer al personal de la planta 0 del IIS Biodonostia, en especial a Amaia, Andrea y Marisabel, por la ayuda ofrecida en cada momento así como la efectividad a la hora de solucionar cualquier duda o problema. En general, muchas gracias a todos. No me quiero olvidar de los distintos grupos que componen el centro: al grupo de Neuro, que sois los cimientos en los que nos hemos basado el resto de grupos y que tanto nos habéis ayudado; a David por tu dedicación y capacidad para enseñar; Bioingeniería, que como quien dice estamos codo con codo y compartimos el día a día; Hepáticas, vecinos y compañeros; a las distintas plataformas y servicios del instituto (Ana A., Ana G., Vir,...) gracias por vuestra ayuda y sobre todo, por vuestra paciencia. Y sin que se me olvide, gracias PRINS porque apoyándonos entre nosotros las cosas son más fáciles (o por lo menos suenan mejor ☺). Os deseo mucha suerte a todos.

Gracias al grupo de Oncología, al Dr. Charles Lawrie y a su grupo: Lorea, Marta, las tres Marías, Luiza, Angela, Ibai, Erika y Peio, que forman un gran equipo con el que compartimos además de laboratorio, buenos y grandes momentos.

Y qué decir de mi grupo, Laura, Leire, Mikel y Juncal, los txikis del equipo que poco a poco vais haciéndoos más grandes y que estoy segura de que vais a terminar cada uno con grandes trabajos. En especial a Leire, por tu ayuda en muchos de los momentos, muchas gracias. Ido, porque como quien dice has sido mi co-co-directora, jeje. Gracias por guiarme en muchos de los momentos y por dejarme aprender de tu experiencia. Estefanía, Paula y Lidia...qué voy a decir de vosotras, habéis sido mi mayor apoyo a lo largo de esta etapa, tanto laboral como a nivel personal. Solo os puedo decir GRACIAS por todo lo que me habéis aportado, que sé que aunque esto termine vamos a poder seguir apoyándonos y compartiendo grandes momentos. Gracias a ti Lidia, he aprendido que todos llevamos un animal en nuestro interior, eres grande delfín.

Aunque no han estado entre poyatas, tengo la suerte de tener a mucha gente a mí alrededor que me han apoyado y ayudado durante este periodo. Gracias a todas mis amigas, Paula, Leire, Patro, Esti, Andrea, Nora, Nerea, Ane, Lara y Mai, porque en estos cuatro años habéis tenido que aguantar de todo y siempre me habéis apoyado. En especial, gracias a Ainhoa y a Gabriela, que en esas cenas de fin de semana me habéis sabido escuchar y aconsejar como solo una amiga sabe hacer.

Gracias a Koldo, Yolanda, Casi, Myriam y Jon, porque me habéis mostrado vuestro apoyo durante este tiempo y ya sois parte de mi familia, gracias a todos. Y a la peque de la casa le quiero agradecer las alegrías que me ha dado, y me da, cada momento que estoy con ella.

A ti Begoña, porque además de ser una de las personas más cercanas, creo que eres una persona admirable y que da gusto hablar contigo.

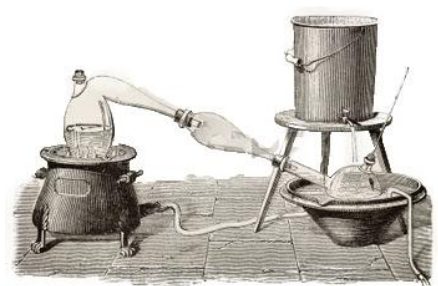
Finalmente, me gustaría dedicar este trabajo a las cuatro personas más influyentes en mí y por las que siento gran admiración.

Aita, ama, Jon...a vosotros sólo os quiero decir: **GRACIAS** de todo corazón por todo lo que me habéis enseñado, por hacerme ser como soy y haberme inculcado unos valores que me han hecho llegar hasta aquí. Gracias por enseñarme que con ganas, actitud y motivación se puede lograr.

Y ya solo queda uno... Iban, a ti solo te puedo dar las gracias por todo, gracias por creer siempre en mí y por apoyarme durante toda esta etapa, por todos los consejos que me das y por dejarme aprender de ti día a día. Tal vez no eres consciente de lo que me has aportado para llegar hasta aquí, pero te puedo asegurar que ha sido mucho. Gracias por sacar lo mejor de mí.

Gracias

RESUMEN

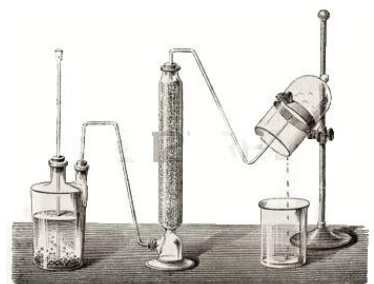


Las células madre adultas son la fuente regeneradora de los distintos tejidos del organismo y tienen como papel fundamental el mantenimiento de la función tisular así como la de responder a distintos tipos de estreses. Cuando se produce un daño en un tejido, son activadas y emigran desde sus nichos hasta el lugar que tienen que reparar. Sin embargo, si se desregulan, pueden desencadenar enfermedades tales como cáncer o enfermedades relacionadas con el envejecimiento. En este trabajo se han estudiado diferentes mecanismos moleculares implicados en la regulación de la células madre neurales (NSC) en los procesos de envejecimiento y Glioblastoma Multiforme (GBM).

Se ha determinado que el factor de transcripción SOX9, necesario en el desarrollo de la cresta neural y el establecimiento del linaje neural durante el desarrollo embrionario, está implicado en el mantenimiento de las NSC en edad adulta donde juega un papel fundamental regulando su capacidad de crecimiento y auto-renovación. Los niveles de SOX9 disminuyen con el envejecimiento de las NSC tanto *in vivo* como *in vitro*. Hemos determinado que la reactivación de SOX9 recupera este declive en la actividad de las NSC asociado al envejecimiento. Además, estos datos se correlacionan con el retraso en el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento observado en el modelo murino Ink4a/Arf/p53, donde elevados niveles de SOX9 junto con otros marcadores de células madre, mantienen la actividad de las NSC. De manera particular, describimos que SOX9 activa el proceso de autofagia, de forma más específica la mediada por chaperonas (CMA), y que esta activación desencadena la inactivación de la vía p38-MAPK por medio de la degradación de MKK6. Identificamos que SOX9 es un biomarcador de juventud implicado en el envejecimiento de las NSC.

Por otro lado, SOX9 tiene un papel oncogénico en GBM regulando la actividad de las GSC. De manera similar a la relación observada en envejecimiento, se ha identificado que existe correlación inversa entre SOX9 y uno de los reguladores esenciales de la vía p38-MAPK, MKP1. Opuesto a lo que se conoce en otro tipo de tumores, hemos determinado que pacientes con GBM presentan niveles elevados de MKP1. Por otro lado, líneas GSC procedentes de pacientes expresan bajos niveles de MKP1, que aumentan bajo condiciones de diferenciación. En este contexto, y con el fin de determinar su función en GBM, se ha determinado que la activación ectópica de esta fosfatasa induce diferenciación de las GSC. Esto se correlaciona por un lado, con un retraso o ausencia de formación de tumores *in vivo*, y por otro, con una mayor supervivencia de los pacientes con GBM con niveles elevados de MKP1.

ABSTRACT



Adult stem cells are the source for regenerating the different tissues of the organism and their main role is the maintenance of tissue function as well as to respond to different types of stresses. When damage occurs in a tissue, they get activated and migrate from their niches to where they need to be repaired. However, if deregulated, they can trigger diseases such as cancer or aging-related diseases. In this work we have studied different molecular mechanisms involved in the regulation of neural stem cells (NSC) in the processes of aging and Glioblastoma Multiforme (GBM).

It has been determined that the transcription factor SOX9, necessary in the development of neural crest and the establishment of neural lineage during embryonic development processes, is involved in the NSC maintenance by regulating their capacity of growth and self-renewal. In this work we demonstrate that SOX9 levels decline with the NSC aging both in vitro and in vivo. We have determined that the reactivation of SOX9 recovers the decline in the activity of NSC associated with aging. Furthermore, these data correlate with the delay in cognitive impairment associated with aging observed in the *Ink4/Arf/p53* mouse model, where high levels of Sox9 together with other stem cell markers, maintain the activity of the NSC. In particular, we describe that SOX9 activates autophagy process, more specifically the one mediated by chaperones (CMA), and that this activation triggers the degradation MKK6, resulting in the no-activation of the p38-MAPK. We identified SOX9 as a youth biomarker involved in the NSC aging.

On the other hand, SOX9 has an oncogenic role in regulating the activity of GSC the GBM. Similarly to what was observed in aging, we have found that there is an inverse correlation between SOX9 and one of the key regulators of p38-MAPK pathway, MKP1.

Opposed to what is known in other types of tumors, we determined that GBM patients express high levels of MKP1. Furthermore, GSC lines from patients express low levels of this phosphatase, which increase under differentiation conditions. In this context and in order to determine its role in GBM, it has been determined that ectopic activation of MKP1 induces differentiation of GSC. This correlates on one hand, with a delay or absence of tumor formation in vivo, and secondly, with increased survival of GBM patients with high MKP1 levels.

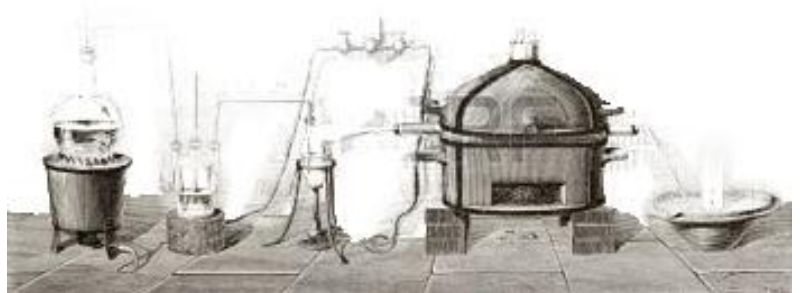
ÍNDICE



AGRADECIMIENTOS	7
RESUMEN	13
ABSTRACT	19
ÍNDICE	23
CLAVE DE ABREVIATURAS	27
INTRODUCCIÓN	33
1. EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO	35
2. EL CÁNCER	35
<i>Cáncer y Envejecimiento: diferencias y similitudes</i>	36
3. ALTERACIONES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL CON EL ENVEJECIMIENTO	37
<i>Las células madre o stem cells</i>	37
Agotamiento de las células madre con el envejecimiento	38
<i>El cerebro</i>	39
<i>Tumores cerebrales: Glioblastoma</i>	39
Clasificación y bases moleculares del Glioblastoma Multiforme	41
Terapias para el tratamiento del GBM	42
Heterogeneidad celular: <i>Cancer Stem Cells</i>	42
4. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN ENVEJECIMIENTO Y CÁNCER	44
<i>Los Factores de Transcripción SOX</i>	44
SOX9 y SOX2 y su papel en las células madre	45
<i>Vías de señalización de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK)</i>	46
<i>Proteínas fosfatasas de MAPK: MKPs</i>	48
MKP1 y Cáncer	49
5. EL PROCESO DE AUTOFAGIA	49
La macroautofagia	50
La microautofagia	50
La autofagia mediada por chaperonas	50
<i>Autofagia: envejecimiento y cáncer</i>	51
OBJETIVOS	53
MATERIALES Y MÉTODOS	57
<i>Modelos animales: cepas de ratones utilizadas</i>	59
<i>Mantenimiento de las colonias experimentales</i>	60
<i>Consideraciones éticas</i>	60
<i>Disección de la SVZ y cultivo</i>	60
<i>Análisis in vivo de la neurogénesis adulta: incorporación de análogos de timidina</i>	61
<i>Ensayos de comportamiento con animales</i>	61
<i>Líneas celulares y su cultivo</i>	61
<i>Generación de fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) y condiciones de cultivo</i>	63
<i>Ensayos de proliferación y auto-renovación de las células madre adultas</i>	64
<i>Plásmidos y cepas bacterianas</i>	64
<i>Transfección de células</i>	65
<i>Infección de células</i>	66
<i>Reactivos y agentes quimioterápicos</i>	66
<i>Tratamientos de líneas celulares</i>	67
<i>Medida de ROS celulares</i>	67
<i>Medida de expresión génica</i>	67
<i>Extracción y cuantificación de proteínas</i>	70

<i>Western Blot</i>	71
<i>Inmunofluorescencia (IF)</i>	73
<i>Inducción de tumores subcutáneos in vivo en ratones</i>	73
<i>Inducción de GBM in vivo mediante inyección esterotáxica en ratones</i>	74
<i>Análisis estadístico</i>	74
RESULTADOS	75
1. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SOX9 CON EL ENVEJECIMIENTO	77
<i>La expresión de SOX9 disminuye con el envejecimiento de las NSC de ratón in vivo</i>	77
<i>Validación mediante un modelo generado in vitro: envejecimiento por pases seriados</i>	80
2. ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SOX9 EN LAS CÉLULAS MADRE NEURALES AL ALARGAMIENTO DE SUPERVIVENCIA DEL ORGANISMO	81
<i>Una copia extra de Ink4/Arf y p53 atenúa la pérdida de función de las NSC asociada al envejecimiento y se refleja en el comportamiento del animal</i>	81
3. REJUVENECIMIENTO DE LAS CÉLULAS MADRE ENVEJECIDAS MEDIADA POR SOX9	85
<i>Reactivación ectópica de SOX9 en las células madre neurales envejecidas C57Bl/6</i>	85
4. MECANISMOS IMPLICADOS EN EL REJUVENECIMIENTO DE LAS CÉLULAS MADRE NEURALES: AUTOFAGIA MEDIADA POR CHAPERONAS Y P38	88
<i>La vía de señalización de p38, asociada a envejecimiento, está implicada en el mecanismo de rejuvenecimiento ejercido por SOX9 en las NSC</i>	88
<i>SOX9 restaura la disminución de la actividad de autofagia asociada al envejecimiento</i>	91
<i>Interrelación entre CMA y la vía p38-MAPK con SOX9</i>	101
<i>MKK6 como sustrato de CMA en el mecanismo de rejuvenecimiento de SOX9 en NSC</i>	103
5. DE NSC A GSC, LA IMPLICACIÓN DE SOX9 EN CÁNCER	105
<i>Altos niveles de SOX9 se correlacionan con altos niveles de SOX2 en GSCs y muestras humanas de glioma</i>	105
6. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA FUNCIÓN DE SOX9 EN GLIOMA: MKP1	107
<i>Correlación inversa entre la expresión de SOX9 y MKP1</i>	107
<i>Las líneas diferenciadas y CSC de GBM presentan niveles bajos de MKP1</i>	108
7. CARACTERIZACIÓN DE MKP1 EN GBM	109
<i>Expresión de MKP1 en muestras de pacientes con GBM</i>	109
<i>Sobre-expresión de MKP1 en líneas celulares de GBM</i>	111
<i>Caracterización de MKP1 en líneas CSC</i>	113
DISCUSIÓN	119
CONCLUSIONES	135
CONCLUSIONS	139
BIBLIOGRAFÍA	143
ANEXO I	159
ANEXO II	161

CLAVE DE ABREVIATURAS



4-OHT: 4-Hidroxitamoxifeno	DMEM: Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
AACR: American Association for Cancer Research. Asociación Americana para la Investigación del Cáncer	DMSO: Dimetilsulfóxido
ADN: Ácido desoxirribonucleico	DUSP: Fosfatasa de especificidad dual
ADN: Ácido desoxirribonucleico	ECL: Enhanced Chemical Luminiscence. Luminiscencia química potenciada
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario	EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid. Acido Etileno Diamino Tetracético
AJCC: Comité Conjunto Americano de Cáncer	EEM.: Error estándar de la media
ARN: Ácido ribonucleico	EGF: Epidermal Growth Factor. Factor de crecimiento epidérmico
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero	EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ASK1: Quinasa reguladora de la señal de apoptosis 1	ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase. Quinasa regulada por señales extracelulares
ATCC: American Type Culture Collection. Colección americana de cultivos	EUROCARE: EUROpean CANcer REgistry-based study on survival and CARE
ATG: Codón de inicio de la traducción (adenosina-timidina-guanosina)	FBS: Suero fetal bovino
ATP: Adenosina trifosfato	GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa
BrdU: Bromodesoxiuridina	GBM: Glioblastoma multiforme
BSA: Bovine serum albumin. Albúmina de suero bovino.	H&E: Hematoxilina y eosina
CDK: Cyclin-Dependent Kinase. Quinasa dependiente de ciclina	H-Ras: Gen Harvey-Ras
CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica.	HSP: Heat Shock Protein. Proteína de choque térmico
CHX: Cicloheximida	HT: Heterocigoto
CMV: Citomegalovirus	IAP: Inhibitor of Apoptosis Proteins. Proteínas inhibidoras de la apoptosis
CPCNP: Cáncer de pulmón de células no pequeñas	IC50: Concentración a la que se produce la mitad de la máxima inhibición
CSC: Cancer Stem Cell, célula madre del cáncer	IF: Inmunofluorescencia
DAPI: 4,6-Diamino-2-fenil-indol	IGF: Insulin-like Growth Factor. Factor de crecimiento insulínico
DG: Giro dentado. Dentate gyrus	
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium. Medio Eagle modificado por Dulbecco	

Abreviaturas

IGF-1R: Type 1 Insulin-like Growth Factor Receptor. Receptor tipo I del factor de crecimiento insulínico

IGFBP: Insulin-like Growth Factor Binding Protein. Proteína de unión al factor de crecimiento insulínico

IHQ: Inmunohistoquímica

INE: Instituto Nacional de Estadística

IP: Ioduro de propidio

JNK: Quinasa del dominio N-terminal de c-Jun

kb: Kilobase

KDa: KiloDalton

KI: Knock-in

KO: Knock-out

K-Ras: Homólogo al oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2

LacZ: Gen que codifica la β -Galactosidasa

LOH: Pérdida de heterocigosidad

LoxP: Sitio de 34 pb en el bacteriófago P1 (locus of X-over P1)

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

MAPKAPK: MAPK activada por quinasa

MAPKK: MAPK quinasa

MAPKKK: MAPKK quinasa

MAPKKKK: MAPKKK quinasa

Mb: Mega base

MCP: Muerte celular programada

MEFs: Fibroblastos embrionarios murinos

MEK: MAP quinasa de ERK

MGMT: Metil Guanina Metil Transferasa.

MKK: MAP quinasa de JNK o p38

MKP: Fosfatasa de MAPK

MKP1: Fosfatasa de MAPK Tipo I

MNK1/2: Quinasas 1 y 2 relacionadas con la señal de MAPK

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio

Myc: Gen de la mielocitomatosis celular

NF- κ B: Factor Nuclear- κ B

NSC: Neural Stem Cell, célula madre neural

NSCLC: Cáncer no microcítico de pulmón

NTC: Non Template Control

OB: Bulbo olfatorio. Olfactory bulb.

OMS: Organización Mundial de la Salud

p16: Inhibidor 2A de quinasas dependientes de ciclina

PARP: Polimerasa Poly (ADP-ribosa)

pb: Pares de bases

PBS: Phosphate Buffered Saline. Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la ADN polimerasa

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor. Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDGFR: Platelet-Derived Growth Factor Receptor. Receptor de factores de crecimiento derivados de plaquetas

PI3K: Fosfoinosítido 3 quinasa

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

poli-A: Secuencia larga de poliadenilato situada unos 20-30 nucleótidos antes del

Q-RT-PCR: Reacción en cadena de la ADN polimerasa cuantitativa a tiempo real

RB: Retinoblastoma

ROS: Reactive Oxygen Species. Especies Reactivas del Oxígeno.

rpm: Revoluciones por minuto

RTK: Receptor tirosina quinasa

RT-PCR: Transcripción Reversa – Reacción en cadena de la ADN polimerasa

S.D: Desviación estándar

SBF: Suero bovino fetal

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SNC: Sistema nervioso central

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription. Transductor de señales y activador de la transcripción

Stat3: Transductor de la señal y activador de la transcripción 3

SVZ: Zona Subventricular. Subventricular zone

TBS: Tris Buffered Saline. Tampón Tris Salino

TEM: Transición Epitelio-Mesenquimal.

TEMED: N,N,N",N"-tetrametiletileno diamina

TGF α : Transforming Growth Factor α . Factor de crecimiento transformante alfa

TGF- α : Factor de crecimiento transformante α

TMZ: Temozolamida

T-TBS: Solución Tris-salino con Tween-20

UICC: Unión Internacional Contra el Cáncer

UTR: Región no traducida

UV-C: Ultravioleta C

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor. Factor de crecimiento endotelial vascular

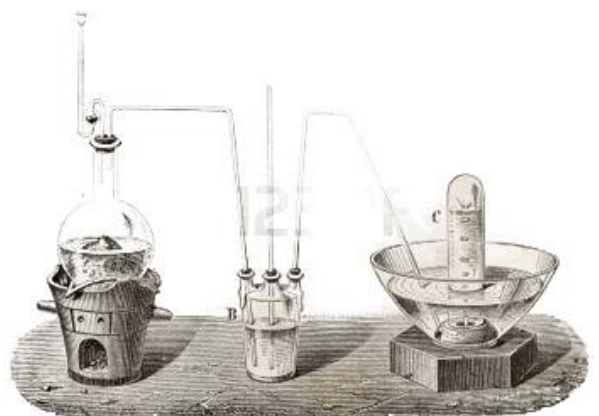
VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor. Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

WB: Western blot

WT: Wild type

X-Gal: 5-Bromo-4-cloro-3-indolil b-D-galactósido

INTRODUCCIÓN



1. EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento podría definirse como el declive funcional que la edad ocasiona en todos los organismos vivos. A lo largo de este periodo se observa una disminución en la eficiencia de los procesos de reparación y mantenimiento celular. En general, es un proceso multifactorial, pudiendo estar causado tanto por factores intrínsecos como extrínsecos (Sharpless and DePinho, 2007). En 2013 se pusieron de manifiesto las causas principales que dan lugar al proceso del envejecimiento, siendo las causas primarias la inestabilidad genómica, el agotamiento de las células madre, el acortamiento de los telómeros y la pérdida de la proteostasis (López-Otín et al. 2013) . El agotamiento de las células madre está asociado a una disminución en el potencial de regeneración tisular mientras que la pérdida de proteostasis tiene que ver con la no eliminación de proteínas defectuosas, que al acumularse en las células causan patologías asociadas al envejecimiento como por ejemplo el alzhéimer, donde las neuronas mueren porque se forman placas de una proteína que debía haberse eliminado. Otra de las causas involucradas en el desarrollo del envejecimiento es la progresiva pérdida de funcionalidad mitocondrial y la mayor acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular, ambos considerados como señales de supervivencia. La inducción de estas señales está dirigida a compensar el deterioro progresivo asociado a la edad, aunque muchas de las veces su inducción resulta tan elevada que termina empeorando dicho deterioro (Hekimi et al. 2011).

En este contexto de múltiples alteraciones a diferentes niveles, la homeostasis de los tejidos se ve afectada pudiendo dar lugar al desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad, entre las que destaca el cáncer.

2. EL CÁNCER

El cáncer es la principal causa de muerte por enfermedad a escala mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente 8,2 millones de personas murieron en el año 2012 a causa de esta enfermedad. Los tipos de cáncer más mortales anualmente son los de pulmón, estómago, hígado, colon y mama (OMS 2012). Para el año 2030 se prevé que el número de casos de cáncer siga aumentando en todo el mundo y alcance la cifra de 22 millones de casos en comparación con los 12 millones registrados en el 2012 (OMS, 2012).

Concretamente en España, datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), reflejan que en el año 2010 el cáncer supuso la segunda causa de muerte por debajo de los 80 años de edad (28,1%), por detrás de las enfermedades cardiovasculares (31,2%). Desde el punto de vista molecular, el desarrollo de un tumor es la consecuencia de un proceso secuencial que incluye alteraciones genéticas y epigenéticas que llevan a una modificación progresiva de las células normales en células transformadas. Se han descrito hasta más de cien tipos de cáncer que poseen alteraciones muy diferentes unos de otros, pero en el año 2000 Hanahan y Weinberg describieron que la gran mayoría de los tipos de cáncer en humanos comparten un pequeño número de alteraciones esenciales para el funcionamiento celular y los resumieron en seis características fundamentales: proliferación independiente de señales mitogénicas, insensibilidad a la señalización anti-proliferativa, evasión de la apoptosis, replicación ilimitada, inducción de angiogénesis, invasión de tejidos circundantes y metástasis. Con el paso de los años, los mismos autores han añadido a la lista, la reprogramación del metabolismo energético, inestabilidad genómica, inflamación y la evasión de la destrucción por el sistema inmune (Hanahan & Weinberg 2011).

Cáncer y Envejecimiento: diferencias y similitudes

A priori, el cáncer y el envejecimiento pueden parecer procesos opuestos: mientras el cáncer es la consecuencia de una ganancia aberrante en el funcionamiento celular, el envejecimiento se caracteriza por una pérdida de parte de esta maquinaria. Sin embargo, el cáncer y el envejecimiento pueden compartir orígenes comunes. Una de las causas generales más comunes que se le han atribuido al proceso de envejecimiento ha sido la acumulación de daño celular (Vijg & Campisi 2008; Gems & Partridge 2013; López-Otín et al. 2013). Al mismo tiempo, este daño celular ocasionalmente puede proporcionar ventajas aberrantes a ciertas células, que según las condiciones específicas en dichas células puede dar lugar a cáncer. Por lo tanto, el cáncer y el envejecimiento pueden considerarse como dos manifestaciones diferentes del mismo proceso subyacente: la acumulación de daño celular. Además, varias de las patologías asociadas con el envejecimiento como son la aterosclerosis o la inflamación, implican sobre-crecimiento celular incontrolado, siendo este una de las características más básicas dentro de las propiedades del cáncer (Blagosklonny 2008). Es por esto por lo que aunque aparentemente son procesos opuestos, tienen características comunes con efectos contrapuestos, como son por ejemplo: el proceso de senescencia, mantenimiento de la estructura telomérica, estabilidad genómica o actividad de las células madre.

3. ALTERACIONES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL CON EL ENVEJECIMIENTO

Las células madre o stem cells

Las **células madre** son células que se encuentran en todos los organismos multicelulares y que cumplen con dos requisitos (Bonfanti et al. 2012)(Liew et al. 2005):

- a. Capacidad de auto-renovación: es la capacidad que les permite perpetuarse mediante divisiones simétricas o asimétricas que dan lugar a las células hijas de características similares a la célula progenitora. Este proceso es el que permite a las células madre mantener su estado indiferenciado durante largos periodos de tiempo, pudiendo mantener su número o incrementarlo ante necesidades homeostáticas o fisiológicas.
- b. Pluripotencia: es la capacidad de diferenciarse a múltiples linajes celulares.

Ambas propiedades hacen de las células madre una importante fuente para la obtención de distintos tipos celulares. En base a su potencialidad, se definen cuatro tipos de células madre (García-Castro 2007; Sell 2004):

- *Totipotentes*: células madre capaces de crecer y dar lugar a un organismo completo. Lo son las células madre embrionarias (ESC).
- *Pluripotentes*: que pueden transformarse en cualquier tejido del cuerpo, excluyendo a la placenta y pueden diferenciarse en casi todas las líneas celulares derivadas de las tres capas germinales embrionarias.
- *Multipotente*: aquella célula que únicamente puede originar tipos celulares de su propio linaje. Un ejemplo son algunas de las células madre adultas, como las células madre neurales.
- *Unipotente*: célula que da lugar a un tipo de célula particular

Las **células madre adultas** (*adult stem cells*, ASC) son células madre, principalmente multipotentes, que se encuentran distribuidas por el cuerpo humano adulto en regiones específicas que se conocen como nichos celulares. Estas células son las responsables de mantener el equilibrio homeostático del cuerpo, encargándose del recambio de las células que

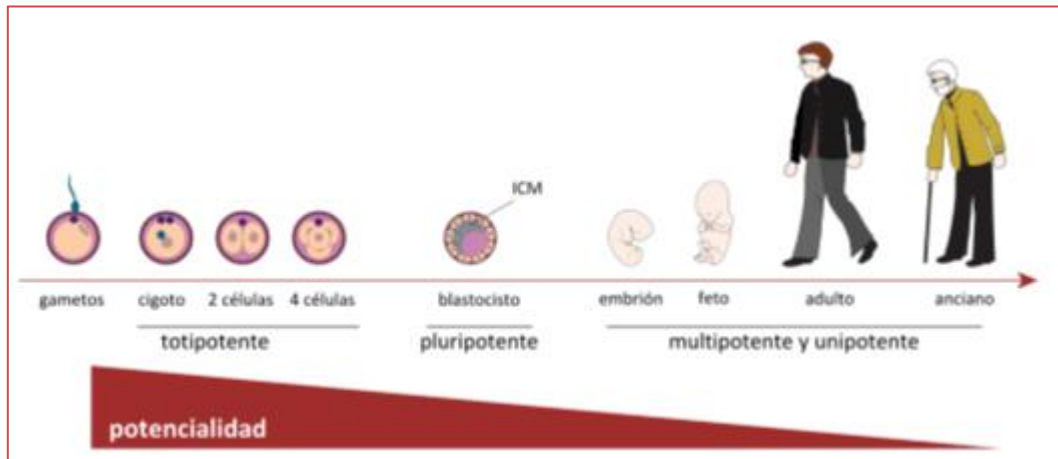


Figura 1. En el cuadro se representa la disminución de la potencialidad a lo largo del ciclo vital del ser humano. ICM: *inner cell mass*; Adaptado de (Mitalipov & Wolf 2009)

han sido destruidas por diferentes razones, como apoptosis, necrosis, exfoliación o senescencia.

Existe un interés médico y científico en estas células gracias a su capacidad de auto-regeneración, su potencialidad, su plasticidad y transdiferenciación en distintos tipos celulares. A nivel molecular, las rutas de señalización más relevantes involucradas en el control de la auto-renovación y potencialidad de estas ASC son entre otros: la ruta de señalización de Notch (Dontu et al. 2004), de Wnt (Kaufman 2010), de Shh (Liu et al. 2006) y ciertos tipos de factores de crecimiento. La mayoría de estas rutas están implicadas en los procesos a lo largo del desarrollo embrionario y a su vez están desreguladas en procesos de transformación celular en varios tipos de cáncer.

Agotamiento de las células madre con el envejecimiento

Se ha descrito la existencia de una desgaste funcional en las células madre adultas de varios tejidos, entre los que se incluyen el cerebro, músculo o hueso (Molofsky et al. 2006; Gruber et al. 2006; Conboy et al. 2013). En este contexto, se ha observado por ejemplo que células madre hematopoyéticas procedentes de ratones envejecidos tienen una menor tasa proliferativa asociada a una mayor acumulación de daño al ADN y una sobre-expresión del marcador de senescencia $p16^{\text{INK4a}}$ (Rossi et al. 2007; Janzen et al. 2006). Entre otros procesos, se ha asociado este declive en la actividad de las células madre con un acortamiento telomérico gradual (Flores & Blasco 2010).

En cualquier caso, aunque está ampliamente descrito que el agotamiento de estas células madre adultas es uno de los factores que limitantes del organismo durante el envejecimiento, también se ha descrito que una proliferación excesiva de estas induce a su vez agotamiento por medio de una disminución del grado de quiescencia característico de estas células (Rera et al. 2011; Kippin et al. 2005).

En mamíferos la neurogénesis posnatal se ha demostrado únicamente en dos regiones del cerebro adulto: la zona subventricular (SVZ) y el giro dentado (DG) del hipocampo. Mientras que la primera está implicada en los procesos de olfacción, el DG está ligado al aprendizaje y la memoria. La función primordial de las células madre neurales adultas de ambas regiones es generar neuronas, aunque se ha descrito que también están implicadas en la gliogénesis, generando oligodendrocitos en la SVZ (Jackson et al. 2006) y astrocitos en el DG (Suh et al. 2007).

El cerebro

El cerebro es un órgano del sistema nervioso central localizado en el encéfalo de los animales vertebrados y la mayoría de los invertebrados. En la especie humana pesa un promedio de 1,3 kg y está compuesto por, aproximadamente, unas 100.000 millones (en un cerebro adulto) de células nerviosas –neuronas– interconectadas, que son las responsables del control de, prácticamente, todas las funciones vitales del organismo. La corteza cerebral que lo protege está dividida longitudinalmente separando los hemisferios izquierdo y derecho, simétricos entre sí e interconectados a través de fibras nerviosas llamadas “cuerpo calloso”. Cada hemisferio a su vez, se divide en cinco lóbulos: frontal, parietal, temporal, occipital y la ínsula de Reil (Bear et al. 2007; Richard Morris. 2003).

El cerebro es considerado de los órganos más importantes y a su vez complejos del organismo, y por tanto cualquier alteración o anomalía relacionada con este puede desencadenar en consecuencias graves para el individuo que la padece.

Tumores cerebrales: Glioblastoma

Según la *National Brain Tumors Society* actualmente se conocen más de 120 tipos de tumores cerebrales, los cuales son clasificados por la OMS en función de su origen celular y agresividad. Los tumores cerebrales primarios han sido tradicionalmente clasificados atendiendo a sus características morfológicas. Según esto, las células de la glía, de origen neuroepitelial y necesarias para la protección y el mantenimiento de las neuronas, serían el origen de un

Introducción

subgrupo de neoplasias conocidas como **gliomas**. Los gliomas representan más de la mitad de los tumores cerebrales y comprenden desde tumores con bajo grado de proliferación e infiltración, a tumores altamente agresivos. Atendiendo a sus características histológicas, los gliomas pueden clasificarse en 4 grados (tabla 1): grado I (astrocitomas pilocíticos), grado II (astrocitomas difusos), grado III (astrocitomas anaplásicos) y grado IV (glioblastoma multiforme, GBM)(Louis et al. 2007). Los **GBM** constituyen aproximadamente el 50% de los gliomas, se caracterizan por presentar una elevada heterogeneidad intratumoral e intertumoral a nivel citopatológico, transcripcional y genómico. Las características principales de los GBM consisten en una elevada tasa de proliferación celular, gran capacidad de inducción de angiogénesis, resistencia a la apoptosis y elevada inestabilidad genética. Además, tienen la capacidad de infiltrarse en las áreas circundantes, haciendo que las intervenciones quirúrgicas para su eliminación sean ineficaces (Furnari et al. 2007).

Grado	Nombre	Edad diagnóstico	Proporción hombre/mujer	Supervivencia (años)
I	Astrocitoma pilocítico	10	1:1	Variable (cura común)
II	Astrocitoma difuso	34	1,18:1	5
III	Astrocitoma anaplásico	41	1,8:1	2
IV	Glioblastoma Multiforme	53	1,5:1	1

Tabla 1 Clasificación según la OMS de tumores astrocíticos y rasgos característicos.

Los GBM son los astrocitomas de mayor grado de malignidad que están caracterizados por presentar una heterogeneidad a todos los niveles, precisamente de donde procede su nombre “multiforme”. Los pacientes afectados presentan una supervivencia media de tan solo un año tras el diagnóstico (Ohgaki 2009), a pesar de la terapia antitumoral basada en una primera resección quirúrgica, seguido de un tratamiento combinado de quimioterapia (Temozolomida) y radioterapia, finalizado con temozolomida adyuvante (Stupp 2005; Wen et al. 2006).

Clasificación y bases moleculares del Glioblastoma Multiforme

Estudios de expresión génica en GBM han permitido analizar la regulación así como las mutaciones presentes en estos tumores, dando así lugar a su clasificación y predicción de respuesta a un tratamiento determinado (Brennan et al. 2009; Van Meir et al. 2010; Verhaak et al. 2010; Brennan et al. 2013). De esta forma, hasta el momento se han descrito 4 subgrupos diferentes de glioblastomas: clásico, mesenquimal, proneural y neural (Verhaak et al. 2010). Las características de cada subgrupo se resumen en la figura 2 (Van Meir et al. 2010). La principal ventaja de definir subgrupos es determinar las diferencias existentes dentro de los glioblastomas. Una vez clasificados pueden ser tratados de manera diferente, pudiéndose aplicar una terapia personalizada a cada uno de ellos, con el fin de obtener una mejor respuesta.

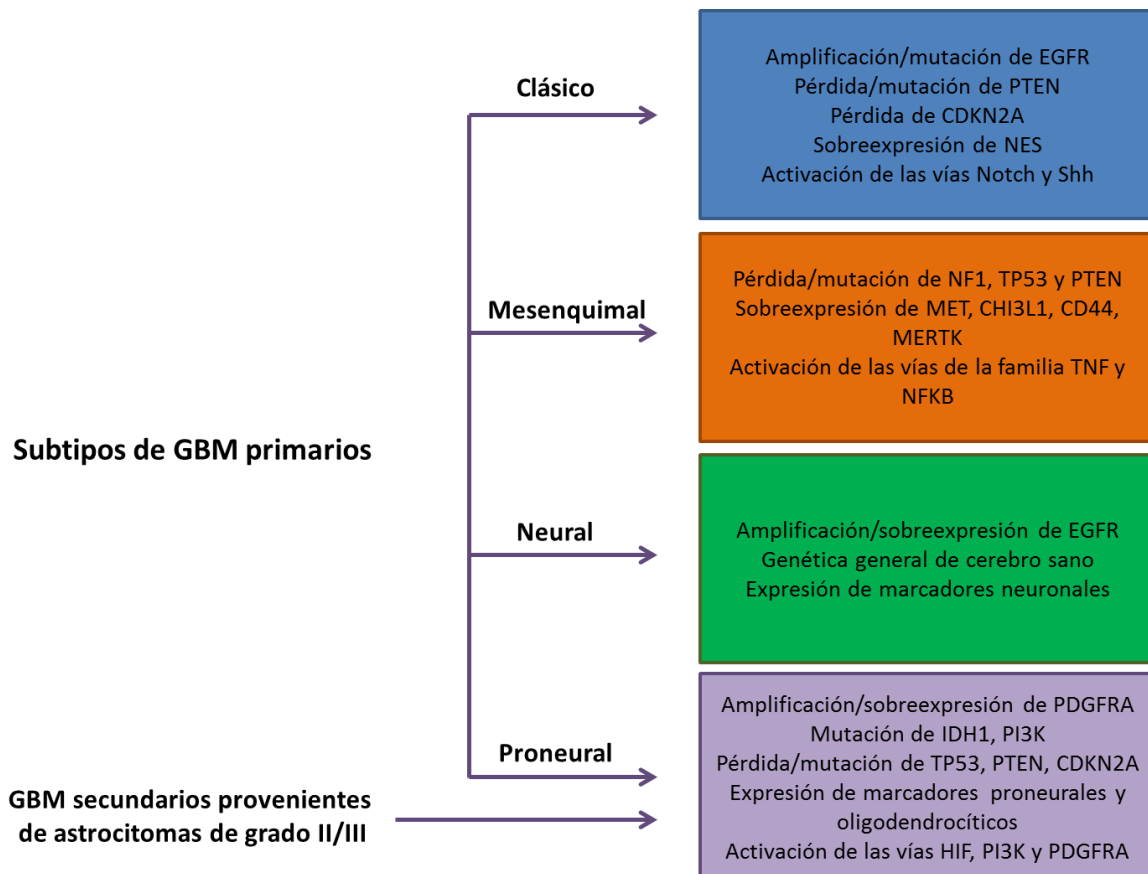


Figura 2. Subtipos de glioblastomas ateniendo a sus características genéticas. Adaptado de Van Meir et al., 2010.

Terapias para el tratamiento del GBM

Actualmente las terapias que se utilizan para el tratamiento de glioblastomas varían en función de si el glioblastoma es de nuevo diagnóstico o es recurrente. Para los de nuevo diagnóstico, como se ha mencionado, la terapia convencional es la resección quirúrgica seguida de radioterapia y quimioterapia. La cirugía permite reducir los síntomas aunque dada la alta capacidad infiltrante de estos tumores la resección nunca es total. Tras la resección quirúrgica el paciente es tratado con radioterapia en conjunto con TMZ a lo largo de unas seis semanas, tras lo cual se continua con el tratamiento de TMZ como adyuvante durante cinco días al mes a lo largo de seis meses (Stupp et al. 2002; Stupp et al. 2009).

El tratamiento de los glioblastomas recurrentes muchas veces incluye la quimioterapia. La elección del o los agentes quimioterápicos depende, entre otros factores, de si se ha utilizado alguno previamente. Normalmente se suele administrar un fármaco diferente para intentar eludir los mecanismos de resistencia (Hou et al. 2006).

Heterogeneidad celular: *Cancer Stem Cells*

Al igual que muchos tipos de tumores, los glioblastomas están compuestos por una mezcla heterogénea de células tumorales. Existen dos teorías que tratan de explicar esta situación: la teoría del modelo estocástico y la de célula madre cancerígena (o *cáncer stem cell*, *csc*)(Figura 3).

El modelo estocástico de crecimiento tumoral propone que todas las células tumorales poseen el mismo potencial de crecimiento y división, aunque después cada célula elige aleatoriamente entre auto-renovarse (dando lugar a dos células hijas con características semejantes a la célula madre original) o diferenciarse (dando origen a dos células hijas orientadas a la diferenciación celular). Así, las células en un tumor no siguen ningún sistema de organización ya que todas las células poseen el mismo potencial intrínseco de contribuir al crecimiento tumoral (Dingli et al. 2007; Nakahata et al. 1982).

El modelo de las CSC en cambio, se basa en la existencia de una subpoblación celular con características de célula madre que mediante divisiones asimétricas dan lugar a dos células hijas con características fenotípicamente distintas: una de ellas mantiene la misma condición no diferenciada de la célula de origen y la otra por su parte, se determina hacia la formación de subtipos intermedios que darán origen a células diferenciadas. De esta forma, la teoría defiende un modelo jerarquizado y heterogéneo en el que las denominadas células madre del cáncer son las encargadas del mantenimiento y progresión del tumor. Durante los últimos

años existen cada vez más evidencias que refuerzan la idea de que los glioblastomas podrían originarse a partir de células madre, de progenitores neurales transformados o de células diferenciadas transformadas (neuronas y oligodendrocitos), de forma que estas células madre transformadas son las CSC y han sido postuladas como las responsables del desarrollo y mantenimiento del tumor (Singh et al. 2004; Wen et al. 2006), así como de la resistencia a las terapias y la recurrencia (Reya et al. 2001).

Teniendo esto en cuenta, las CSC se podrían convertir en las dianas específicas de las nuevas terapias, de forma que una vez eliminadas, bastaría con utilizar terapias convencionales para eliminar las células diferenciadas y llegar así a una regresión estable del tumor (Wen et al. 2006; Singh et al. 2004; Liu et al. 2006).

Desde el aislamiento de estas células madre, son ya varias vías las que se han descrito que pueden tener un papel importante en el mantenimiento de su estado indiferenciado entre las que destacan: Sonic Hedgehog, Notch, Jak/Stat, MAPK o PI3K/Akt. La mayoría de estas vías, antes de verse implicadas en procesos tumorigénicos, habían sido ya descritas durante los procesos de desarrollo embrionario donde son estrictamente necesarias para el mantenimiento y homeostasis de las células madre a lo largo de este proceso. Estos datos implican que la posible inhibición de dichas vías podría resultar en una de las estrategias interesantes a la hora de la búsqueda de tratamientos de pacientes por la que la inhibición del crecimiento de estas CSC ayudaría al tratamiento combinado con los agentes convencionales de radioterapia y TMZ (Hambardzumyan et al. 2008; Bleau et al. 2009).

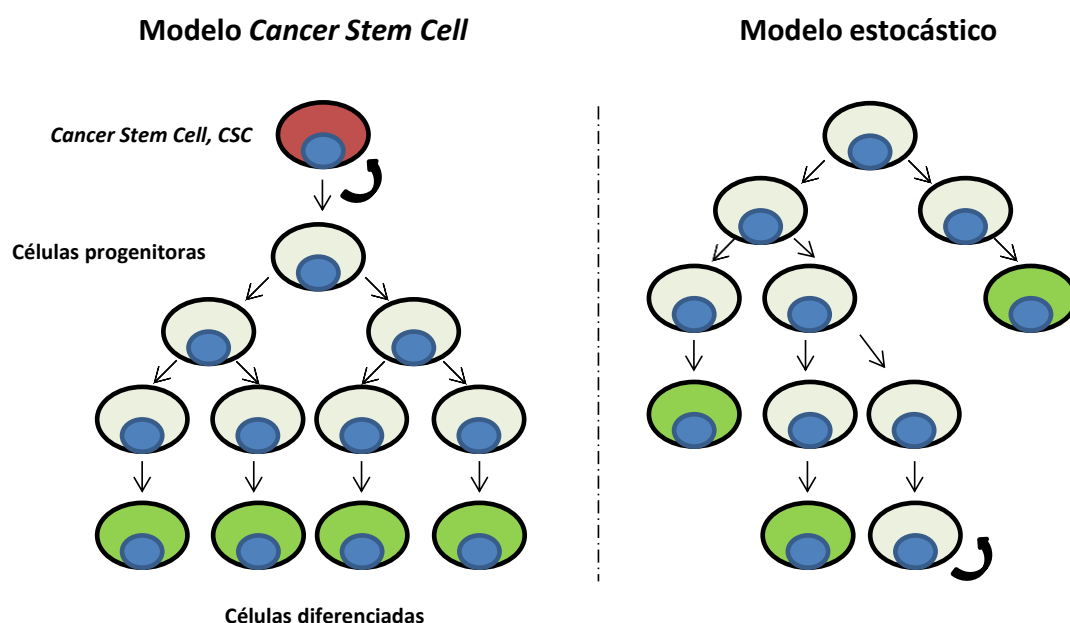


Figura 3. La teoría de las *cáncer stem cells* sugiere una clara jerarquía de las células en un tumor. El modelo estocástico en cambio, mantiene que el crecimiento del tumor es un proceso aleatorio en el que todas las células pueden contribuir.

4. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN ENVEJECIMIENTO Y CÁNCER

Los Factores de Transcripción SOX

Los factores de transcripción de la familia SOX desempeñan un papel fundamental durante el desarrollo embrionario y son vitales para el mantenimiento de las poblaciones de células madre presentes en los tejidos adultos. La familia SOX se caracteriza por poseer un dominio conservado de alta movilidad (HMG, high mobility group) que participa en la unión al surco menor del ADN (Akiyama 2006). Estos factores de transcripción están filogenéticamente conservados en especies como pez cebra, mosca, ratón y humanos, donde se han identificado 20 miembros, divididos en 8 subgrupos en función de la homología del dominio HMG, estructura o función que desempeñan en el organismo (Sarkar & Hochedlinger 2013). Durante la embriogénesis, estos factores de transcripción desarrollan un papel importante en la determinación del sexo, gastrulación temprana, neurogénesis y hematopoyesis. A lo largo de estos procesos, los factores SOX se ocupan del mantenimiento del estado no diferenciado de las células madre así como de la determinación hacia determinados tipos celulares en la génesis de tejidos, destacando entre estos el sistema nervioso central (SNC) (Sarkar & Hochedlinger 2013). Además de este papel en la regulación de las células madre a lo largo del desarrollo, trabajos recientes confirman que estos factores SOX juegan también un papel fundamental en las células madre adultas y por consiguiente, en la homeostasis de diversos tejidos a lo largo de la etapa adulta (Sarkar & Hochedlinger 2013; Arnold et al. 2011).

Teniendo en cuenta estos datos, en los últimos años ha crecido el número de evidencias que demuestran que mutaciones y posibles desregulaciones de los factores SOX están implicados en varias enfermedades humanas, incluyendo una variedad de cánceres (Castillo & Sanchez-Céspedes 2012). En los tumores en los que han sido involucrados, se ha descrito que el origen se da en los tejidos que presentan un patrón de expresión de estos factores similar al observado durante el desarrollo embrionario. Dado que los factores de SOX juegan un papel en el mantenimiento de las células madre neurales y en la especificación y diferenciación a los distintos linajes neurales, parece razonable suponer que la expresión aberrante de los miembros de esta familia está implicada en el desarrollo y mantenimiento de los tumores del sistema nervioso central (de la Rocha et al. 2014).

SOX9 y SOX2 y su papel en las células madre

Los factores de transcripción SOX9 y SOX2 son miembros de esta familia SOX implicados dentro de los procesos asociados al desarrollo embrionario, en la formación de tejidos, desarrollo de la cresta neural o la determinación del sexo masculino (Pritchett et al. 2011). En el caso de **SOX9**, su expresión debe estar estrictamente controlada ya que tanto su total inactivación como su sobre-expresión provocan letalidad embrionaria en ratón. En humanos, se ha descrito que mutaciones heterocigotas pueden dar lugar a Displasia Campomélica, síndrome que se caracteriza por presentar malformaciones esqueléticas así como defectos en diversos órganos, dentro de los que está el sistema nervioso central (Pritchett et al. 2011). SOX9 se expresa en multitud de tejidos y órganos durante el proceso de embriogénesis (corazón, pulmón, páncreas, retina o SNC entre otros) donde, como se ha mencionado, mantiene el estado indiferenciado de las células madre así como está implicado en la diferenciación a distintos tipos celulares (Pritchett et al. 2011). Más recientemente se le han atribuido funciones tanto en la organogénesis como en mantenimiento del sistema nervioso central, páncreas, mama e hígado adulto mediante la regulación de la población de células madre adultas existentes en estos tejidos (Scott et al. 2010; Furuyama et al. 2011; Guo et al. 2012; Matheu et al. 2012). En relación con esta función, se ha implicado a SOX9 en cáncer, donde se le han atribuido funciones de regulación y mantenimiento de las CSC del tumor (Matheu et al. 2012; Kordes & Hagel 2006).

Dentro del sistema nervioso central, SOX9 parece tener una función importante en el cerebro. Por un lado, se ha determinado que SOX9 es necesario para el mantenimiento de la multipotencialidad de las NSC tanto *in vivo* como *in vitro* en el SNC tanto adulto como embrionario, y es esencial en la determinación de estas NSC durante los estadios tardíos de la gliogénesis (Scott et al. 2010; Stolt et al. 2003). Por otro lado, dentro del papel que se le ha atribuido a SOX9 en cáncer, uno de los tumores es el GBM, donde estas células tumorales presentan niveles de SOX9 más elevados respecto a células del tejido cerebral sano. Es más, se ha descrito que una mayor expresión de SOX9 se correlaciona con un mayor grado de malignidad de estos tumores hasta el punto en el que la sobre-expresión de este factor ayuda en la transformación de NSC (Kordes & Hagel 2006; Swartling et al. 2012).

SOX2 es uno de los reguladores que controla, junto con otros factores como Oct4 o c-Myc, la auto-renovación y la pluripotencia de las células madre embrionarias o ESC en los estadios más tempranos de la embriogénesis (Welstead et al. 2008; Jaenisch & Young 2008). De hecho, estos tres junto con Klf4, se han descrito como los cuatro necesarios para reprogramar células

somáticas a células madre pluripotentes inducidas (iPS), con las que es posible derivar células del linaje neural (Yamanaka 2007). En los estadios más tardíos en cambio, SOX2 se expresa en diversos tejidos epiteliales y neurales (Hutton & Pevny 2010; Wegner 2005; Driessens & Blanpain 2011). Al igual que SOX9, los ratones homocigotos nulos para Sox2 presentan una muerte prematura en las etapas iniciales de la embriogénesis (Avilion et al. 2003). En el adulto, utilizando como modelo el ratón SOX2-GFP, donde uno de los alelos de SOX2 ha sido reemplazado por el de EGFP, se demostró la existencia de progenitores que presentaban altos niveles de SOX2 en regiones neurogénicas (SVZ, bulbo olfatorio o giro dentado) y que tras su aislamiento, eran capaces de dar lugar los tres linajes neurales: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, demostrando así poseer propiedades multipotenciales propiamente *stem* (Ellis et al. 2004; Suh et al. 2007).

Vías de señalización de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK)

Con el fin de sobrevivir y llevar a cabo sus funciones, las células deben responder a un gran número de estímulos extracelulares y cambios medioambientales como mitógenos, hormonas, estrés nutricional, térmico, osmótico, etc. Las vías de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) media esta señalización a través de fosforilaciones secuenciales y tienen como resultado la regulación de diversos procesos celulares como proliferación, diferenciación, respuesta a estrés, inflamación, parada del crecimiento y apoptosis. En mamíferos, la familia de las MAPK consta de las quinasas reguladas por señales extracelulares o ERK, y de las proteínas quinasas reguladas por estrés: p38 (isoformas α , β , γ y δ) y JNK (quinasas del extremo terminal de c-Jun). Estas vías están compuestas por un módulo de tres quinasas que se activan por fosforilación en cascada estando cada módulo compuesto por: una MAPK quinasa quinasa (MAP3K), una MAPK quinasa (MAP2K) y una MAPK., que una vez activada se transloca del citoplasma al núcleo donde fosforila y activa a sus principales sustratos, siendo la mayoría factores de transcripción. A través del efecto que tienen sus funciones, algunas de estas MAPK se han descrito estar en relación directa con el proceso de envejecimiento (Hsieh & Papaconstantinou 2002; Li et al. 2011; Bernet et al. 2014) y además, anomalías en algunas de estas señalizaciones juegan un papel fundamental en el desarrollo y progresión del cáncer (Dhillon et al. 2007) (Figura 4).

La vía de señalización de **ERK** se encuentra alterada en un 30% de cánceres humanos y está asociada a la capacidad de las células tumorales para crecer de forma independiente de las señales proliferativas (Keyse 2008). Estas proteínas actúan en respuesta a la activación de

receptores tirosina quinasa (RTK) y receptores acoplados a la proteína G (GPCR), entre otros (Marmor et al. 2004; Naor et al. 2000). Esto hace que la vía sea activada por varios agentes extracelulares como factores de crecimiento, hormonas y estrés que terminan induciendo diferentes procesos que incluyen principalmente la proliferación y diferenciación (Aoki et al. 2008). Por otro lado, la **vía JNK** juega un papel importante en la respuesta a estrés y en la inducción de apoptosis en respuesta a diferentes estímulos. Tres genes son los que codifican las proteínas JNK: mientras JNK1 y JNK2 se expresan en casi todas las células, JNK3 se encuentra principalmente en el cerebro (Dreskin et al. 2001). Tras la activación, las JNKs se translocan al núcleo donde activan a sus dianas, que en su mayoría son factores de transcripción como Elk1 o las proteínas AP-1, que incluyen c-jun, junB, junD y ATF-2 (Chattopadhyay et al. 2006). Finalmente, la **vía p38** participa, al igual que JNK, principalmente en respuesta a estrés, pero también en otros procesos como respuesta inmune e inflamación (Han & Sun 2007; Cuenda & Rousseau 2007). Su actividad es inducida por diversos factores de estrés y ligandos que actúan a través de receptores entre los que se incluyen los receptores relacionados con apoptosis, GPCRs, y RTKs. Las principales MAPKKs de la vía p38 son MKK6 y MKK3 y su activación tiene lugar por fosforilación de los residuos tirosina y treonina que, posteriormente viajan al núcleo donde fosforilan a sus diversos sustratos, muchos de los cuales están relacionados tanto con la regulación del ciclo celular como con la apoptosis (Dhillon et al. 2007).

Módulo	ERK	JNK	p38
Receptor	RTKs, GPCRs	Citoquinas, GPCRs	Estrés, Citoquinas
MAPK3K	Raf, TPL2	MEKK, MLK, ASK, TPL2	MEKK, MLK, ASK, TPL2
MAPK2K	MEK 1/2	MKK4/7	MKK3/6
MAPK	ERK 1/2	JNK1/2/3	P38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$
Sustratos	C-myc, MK1, Rsk1/2...	C-Jun, ATF2, JunD...	GAD153, ATF2, Msk1...

Figura 4. Estructura general de la señalización por MAPK. Mayor et al, 2007.

La vía p38-MAPK en envejecimiento y cáncer

Se ha descrito que la vía p38-MAPK aumenta a lo largo del proceso del envejecimiento como consecuencia de una mayor acumulación de radicales libres debido a un aumento del estrés oxidativo y una menor capacidad antioxidante (Li et al. 2011; Davis et al. 2005). En relación a este dato, se ha asociado a la activación de la vía p38-MAPK con una disminución en la capacidad proliferativa asociada al envejecimiento de las células madre en músculo, pulmón y páncreas, y se ha descrito que su inhibición podría revertir ese fenotipo envejecido en dichas células (Bernet et al. 2014; Jones et al. 2005; Brien et al. 2013; Ventura et al. 2007; Wong et al. 2009).

Por otro lado, debida a la doble funcionalidad de esta MAPK (como regulador del ciclo celular así como del proceso de apoptosis), se ha determinado que p38 tiene un papel importante en cáncer, donde se ha visto que actúa como oncogén dando lugar a una proliferación independiente de los factores decrecimiento, (Ambrosino & Nebreda, 2001) así como gen supresor tumoral mediante el cual muchos agentes quimioterápicos requieren de su actividad para inducir apoptosis (Losa et al. 2003). En el caso de GBM, se ha observado que la activación de p38 está relacionada con un peor pronóstico de los pacientes y que una terapia combinada de un inhibidor de esta MAPK junto con quimioterapia basada en Vandetanib reduce la supervivencia de las células tumorales (Sooman et al. 2013).

Proteínas fosfatasa de MAPK: MKPs

Las fosfatasa de MAPK (MKPs) son miembros de la familia de fosfatasa de especificidad dual (DUSPs). (Alonso et al. 2004; Dickinson & Keyse 2006; Kondoh & Nishida 2007; Theodosiou et al. 2002). Muchas MKPs son inducidas en respuesta a la activación de la vía de las MAPKs y actúan como reguladores negativos endógenos de su señalización regulando la actividad de la vía de las MAPKs mediante defosforilación simultánea de los residuos serina/treonina y residuos tirosina (Wu 2007; Tarrega 2010). La especificidad de las MKPs reside en unas secuencias de su dominio N-terminal conocidas como motivo de interacciónquinasa (KIM; Kinase Interaction Motif). Esta familia de las MKP está formada por 11 miembros que se dividen en tres grupos de acuerdo a su similitud de secuencia, localización subcelular y especificidad de sustrato (Alonso et al. 2004; Owens & Keyse 2007; Wu 2007):

1. MKPs nucleares inducibles: grupo formado por **DUSP1/MKP1**, DUSP2/PAC-1, DUSP4/MKP2 y DUSP5/hVH-3. Son proteínas nucleares, rápidamente inducibles por estímulos mitogénicos y/o estrés y con especificidad hacia ERK1/2, JNK1/2 y p38.

2. MKPs citoplásmicas con especificidad hacia ERK1/2: constituido por DUSP6/MKP3, DUSP7/MKP-X y DUSP9/MKP4 que son proteínas citoplasmáticas que inactivan específicamente a ERK1/2.

3. MKPs que inactivan a JNK1/2 y p38: este grupo comprende DUSP8/hVH-5.

MKP1 y Cáncer

MKP1/DUSP1 (MAP-Kinase-Phosphatase Type I/ Dual-Specificity-Phosphatase Type I) pertenece a la familia de las MKP, de localización nuclear y de expresión es inducible por estímulos mitogénicos, inflamatorios y por daño al ADN (Boutros et al. 2008; Keyse 2008). Entre sus sustratos, MKP1 tiene mayor afinidad por p38 y JNK que por ERK. Puesto que MKP1 controla la actividad de las MAPK y estas juegan un papel importante en cáncer, es lógico pensar que esta fosfatasa pueda tener un papel importante en la inducción y progresión tumoral. Se ha descrito que la expresión de MKP1 está alterada en cáncer de colon, próstata, vejiga, ovario, mama y CNMP (Owens & Keyse 2007; Wang et al. 2003). Mientras que en varios tipos de cáncer como CNMP, carcinoma de ovario o cáncer próstata los niveles de MKP1 son elevados (Wang et al. 2003; Chattopadhyay et al. 2006; Cortes-Sempere et al. 2009), en carcinoma hepatocelular o testicular los niveles de esta fosfatasa están disminuidos (Murty et al. 1996; Peng et al. 1999). Además, se han descrito trabajos que asocian a MKP1 con la resistencia a quimioterapia (Wang et al. 2007; Wang et al. 2006), por lo que todo esto hace de MKP1 una proteína a tener en cuenta a la hora de estudiar muchos tipos de tumores.

5. EL PROCESO DE AUTOFAGIA

La autofagia es un proceso altamente conservado al que inicialmente se le atribuía la degradación de proteínas, pero que actualmente se ha descrito que además tiene funciones de reciclaje y degradación de biomoléculas (Mizushima & Klionsky 2007). En mamíferos, al igual que en muchas otras especies, la autofagia se manifiesta principalmente en respuesta a la ausencia de nutrientes (Mizushima 2004).

Las células eucariotas tienen dos principales mecanismos de degradación de proteínas: el proteasoma y los lisosomas (Klionsky 2007). Mientras que el proteasoma es un complejo multicatalítico de proteasas que degrada la mayoría de las proteínas endógenas, mal plegadas o dañadas, los lisosomas, son los encargados de degradar componentes citoplasmáticos y proteínas extracelulares que provienen de la autofagia. Existen tres tipos diferentes de

autofagia en función del mecanismo por el cual el material a degradar llega al lisosoma: macroautofagia, microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas (Mizushima & Klionsky 2007) (Figura 5).

La macroautofagia

La **macroautofagia** es un proceso de reordenamiento y fusión de membranas (Yorimitsu T, 2005; Mizushima, 2005). La macroautofagia, a veces denominada simplemente como “autofagia”, implica el englobe de proteínas, orgánulos y citoplasma en una estructura llamada autofagosoma, que una vez formado se fusiona con el lisosoma liberando su contenido en el lumen lisosomal. Dentro del lisosoma las proteasas presentes en dicho lumen degradan el contenido para que posteriormente las moléculas resultantes sean liberadas hacia el citosol de forma que están disponibles para la resíntesis de diferentes componentes intracelulares (Yorimitsu & Klionsky 2005) (Figura 2).

La microautofagia

En la **microautofagia** también se lleva a cabo la degradación de proteínas y orgánulos, pero a diferencia de la macroautofagia es el lisosoma quien engloba directamente el contenido a degradar. Es un proceso independiente a la adaptación durante la ausencia de nutrientes (Todde et al. 2009; Nakatogawa et al. 2009). Este proceso ha sido ampliamente caracterizado en levaduras, sin embargo, la ausencia de genes homólogos en mamíferos, ha dificultado el conocimiento de este proceso (Wong & Cuervo 2010).

La autofagia mediada por chaperonas

La **autofagia mediada por chaperonas** o **CMA**, es el tipo de autofagia más específico de los tres. En este proceso el sustrato a degradar siempre es una proteína, que migra directamente a la membrana del lisosoma tras unirse a la chaperona HSC70 y otras co-chaperonas que reconocen específicamente la secuencia consenso KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) (Orenstein & Cuervo 2010; Lilienbaum 2013). La unión de la proteína al lisosoma se produce a través del receptor LAMP-2A (L2A), siendo esta unión crucial para el proceso. Se requiere que la proteína se despliegue totalmente para que se ingrese en el lumen del lisosoma a través de un complejo en forma de canal formado por varias proteínas L2A (Ashish C. Massey et al. 2006; Mizushima & Komatsu 2011). Aunque todas las células presentan una CMA basal, la mayor

activación de este proceso se produce como respuesta a situaciones de estrés, como por ejemplo ante estrés oxidativo, y es de gran importancia en la señalización celular.

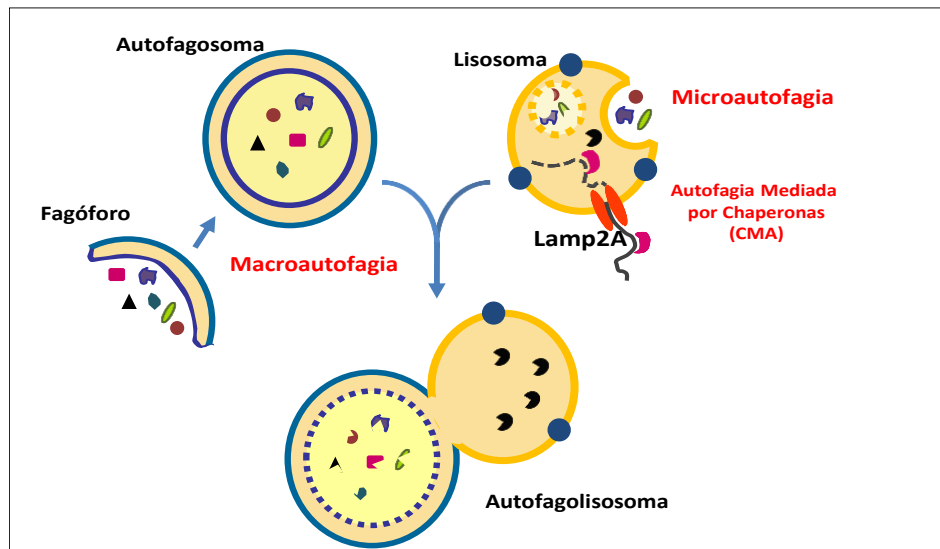


Figura 5. Los diferentes tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. Adaptado de Mizushima et al, 2007.

Autofagia: envejecimiento y cáncer

Más allá de su función en la homeostasis celular, la autofagia ha sido descrita como uno de los sellos característicos del proceso de envejecimiento (López-Otín et al. 2013). Una característica común del envejecimiento celular es la acumulación de proteínas y orgánulos dañados, siendo estos especialmente negativos en las células diferenciadas que ya no se dividen como las neuronas. La expresión crónica de las proteínas no plegadas, mal plegadas o agregados contribuye al desarrollo de algunas patologías relacionadas con la edad, tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y cataratas (Powers et al. 2009). Una disminución en el proceso de autofagia (modelos de ratón con la autofagia alterada) ha sido asociado a un envejecimiento acelerado (Hara et al. 2006; Komatsu et al. 2005), mientras que la estimulación de la autofagia, por ejemplo mediante restricción calórica, podría tener efectos anti-envejecimiento (Madeo et al. 2010; Bergamini 2005). Los ratones transgénicos con una copia adicional de la LAMP2a no experimentan un declive en el proceso de autofagia asociado a envejecimiento, y preservan mejor la función hepática a lo largo del tiempo (Zhang & Cuervo 2008). Se han utilizado inductores de autofagia como la rapamicina, que a través de la inhibición de la vía de mTOR aumenta la vida útil de los ratones de mediana edad retrasando varios aspectos del envejecimiento (Blagosklonny 2011; Harrison et al. 2009; Wilkinson et al.

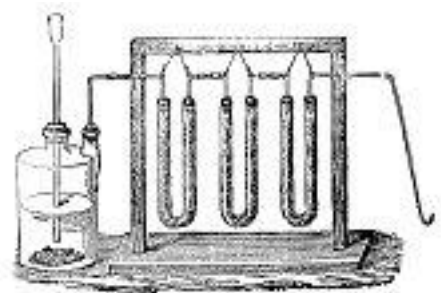
2012). Este efecto de la rapamicina se ha demostrado que es estrictamente dependiente de la inducción de la autofagia en levaduras, nematodos y moscas (Bjedov et al. 2010; Rubinsztein et al. 2011), sin embargo no existen evidencias similares acerca de los efectos de la rapamicina sobre el envejecimiento en mamíferos.

Asociado al envejecimiento, existen evidencias que demuestran que la autofagia también puede desempeñar un papel importante durante la diferenciación celular y mantenimiento de las células madre hematopoyéticas progenitoras (HSPCs). Por medio de la degradación de orgánulos y proteínas, el proceso de autofagia podría estar ayudando a las células en diferenciación a eliminar el material que no necesitan, como las mitocondrias durante la diferenciación de los adipocitos (Y Zhang et al. 2009). Además, gracias a la prevención de la acumulación de mitocondrias dañadas, la autofagia contribuye al mantenimiento de bajos niveles de ROS en HSPCs de forma que impide la pérdida de su capacidad de auto-renovación y viabilidad (Ito et al. 2004; St John et al. 2006). Incluso se ha postulado a la autofagia como uno de los mecanismos necesarios para el remodelado durante la generación de células madre pluripotentes inducidas (iPS) (Prigione et al. 2010).

El proceso de autofagia ha sido relacionado con diferentes enfermedades asociadas al envejecimiento entre las que destaca el cáncer. De hecho, el cáncer fue una de las primeras enfermedades que se relacionó con la autofagia. En el 40-75% de los casos de cáncer de mama, de ovario y de próstata se observa la pérdida de uno de los alelos del gen beclina 1 (Yue et al. 2003; Qu et al. 2003). Existen evidencias sobre la interrelación entre las rutas de señalización oncogénica y las de la autofagia: oncogenes como PI3K, PKB, TOR o Bcl-2 inhiben la autofagia mientras que genes supresores de tumores como p53, PTEN, o TSC1/TSC2 estimulan la autofagia. Además de beclina 1, existen otros genes implicados en la estimulación de la autofagia que refuerzan la actividad supresora tumoral de esta en cáncer (Botti et al. 2006).

Teniendo en cuenta que la autofagia es un proceso propiamente de supervivencia celular, suena paradójico el hecho de que tenga un papel supresor tumoral en multitud de tumores. Basándose en esto, se ha postulado que podría tener una doble función en el cáncer: la autofagia como proceso oncogénico ya que podría estar actuando como mecanismo citoprotectivo que ayuda a las células tumorales en la resistencia a diferentes tratamientos y en la supervivencia en condiciones de ausencia de nutrientes, y por otro lado la autofagia como supresora tumoral argumentando que elimina los orgánulos dañados y factores de crecimiento disminuyendo así la inestabilidad genética (Mathew et al. 2007).

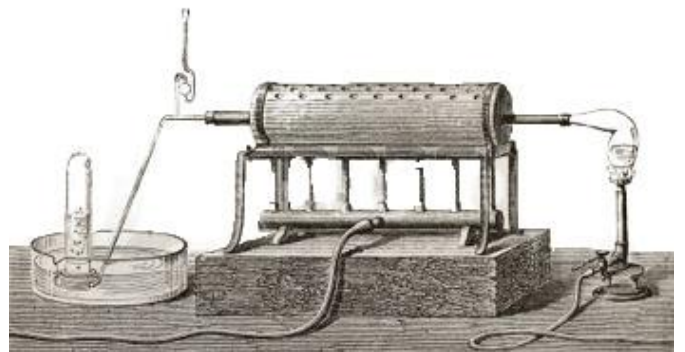
OBJETIVOS



El objetivo principal de este trabajo es profundizar en los mecanismos moleculares que regulan las células madre en los procesos de envejecimiento y cáncer en el cerebro.

1. Caracterizar la función de SOX9 en el envejecimiento de las NSC
2. Estudiar el proceso de autofagia en el envejecimiento de las NSC
3. Determinar la implicación de la vía p38-MAPK en el envejecimiento de las NSC
4. Identificar dianas que forman parte del mecanismo ejercido por SOX9 en GBM: MKP1
5. Caracterizar la expresión de MKP1 en GBM y su posible implicación en la regulación de las *cancer stem cells (CSC)*

MATERIALES Y MÉTODOS



Modelos animales: cepas de ratones utilizadas

Las diferentes cepas de ratones empleadas en este trabajo, así como sus características y origen, se detallan en la Tabla 2.

Cepa	Características	Referencia
B6;129S- Sox2tm2Hoch/J (SOX2-GFP)	Cepa con delección de uno de los alelos de SOX2 y en su lugar tiene el inserto de GFP	https://www.jax.org/strain/017592
C57BL/6	Cepa consanguínea de ratones sin ninguna alteración genética	https://www.jax.org/strain/000664
P38 α ^{lox/lox} CamIIICreTg/+	Cepa consanguínea con delección del gen p38 α con fondo C57BL/6	(Engel et al. 2005)
Tg(Sox9- cre/ERT2)1Msan/J (Z/SOX9)	Cepa consanguínea con sobre-expresión del gen SOX9 con un fondo C57BL6/129	(Matheu et al. 2012)
B6.129S7- Sox9tm2Crm/J (Sox9 ^{flox/Flox})	Cepa consanguínea con delección del gen Sox9 con un fondo C57BL6/129	(Matheu et al. 2012)
L2AcKO	Cepa C57BL/6 con delección de la isoforma A del gen de Lamp2	(Tanaka et al. 2000)
FVB/NJ (Dendra)	Cepa reportera de CMA	https://www.jax.org/strain/001800
NOD.CB17- Prkdcscid/NcrCrI (Nod-Scid)	Cepa deficiente en linfocitos B y T	https://www.jax.org/strain/001303
Nude J(Nu/Nu)	Cepa atímica, deficiente en linfocitos T	https://www.jax.org/strain/007850
s-Ink4/Arf/p53	Cepa con una copia extra del locus Ink4/Arf y p53	(Matheu et al. 2007)

Tabla 2. Características de las cepas de ratones utilizadas. WT: wild type; KO: knock-out, Flox: floxed

Mantenimiento de las colonias experimentales

Se establecieron colonias de entre 15 y 30 ratones (según la cepa) de cada genotipo (C57BL/6, s-Ink4/Arf/p53, Nude, Nod-Scid, Sox9^{flox/Flox} y SOX9Tg) mediante cruces en heterocigosis y homocigosis (cuando fue posible). Los ratones fueron criados en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal del Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia (IIS Biodonostia) así como en el MRC National Institute of Medical Research (NIMR), en áreas específicas para esta especie ventiladas, esterilizadas y manteniéndose controladas las condiciones de luz, temperatura, humedad, presión, comida y agua, cumpliendo los requisitos necesarios para estabular dichas especies (nº de registro en la Dirección General de Ganadería 28079 –37-A). Todos los ratones fueron viables y fértiles y cuando se detectó cualquier signo importante de enfermedad, los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂ con el fin de evitar el sufrimiento del animal. Todos los procedimientos con los animales se llevaron a cabo basándose en lo estipulado por el Consejo de las Comunidades Europeas, directiva 86/609/EEC.

Consideraciones éticas

El uso de las muestras procedentes de tumores humanos para este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético del Hospital La Fe de Valencia así como el del Hospital Donostia de San Sebastián. Todos los pacientes dieron un consentimiento informado. Asimismo, todos los animales de experimentación utilizados en este trabajo han sido mantenidos en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal del Instituto de Investigación Biodonostia, siguiendo las directrices de la autoridad competente del Gobierno Español y de acuerdo a las normas establecidas por el Consejo de las Comunidades Europeas, directiva 86/609/EEC.

Disección de la SVZ y cultivo

Tras el sacrificio y posterior decapitación de ratones jóvenes (1-2 meses), adultos (12 meses) y envejecidos (24 meses), los hemisferios cerebrales se extrajeron con rapidez y se separaron en tampón fosfato salino (PBS 1X, Gibco) a 4°C. Se retiró el cerebelo y a continuación se realizaron secciones coronales de 350-400 µm de grosor con un bisturí. La SVZ se diseccionó cuidadosamente con la ayuda de micropinzas para preparar explantes de, aproximadamente, 200-300 µm de diámetro. Una vez diseccionada la zona, se procedió a la disgregación mecánica y enzimática en un medio DMEM/F12 con 10% de papaína (Promega) y 0.7% de

DNasa (Invitrogen). Las células se mantuvieron en este medio de disgregación a 37°C durante 30 minutos en agitación, tras lo cual fueron lavadas con PBS 1x y finalmente cultivadas en su correspondiente medio de cultivo, DMEM/F12 suplementado con los factores de crecimiento EGF y bFGF.

Análisis in vivo de la neurogénesis adulta: incorporación de análogos de timidina

Los ratones adultos (n=4 ratones; 12 meses) y los envejecidos (n=4 ratones; 24 meses) recibieron una inyección intraperitoneal de BrdU cada día durante 7 días (300 mg BrdU/kg de peso corporal, 10 mg/ml, Sigma-Aldrich; (Gómez-Gavira et al. 2012). Tras 28 días, los animales fueron sacrificados y sus tejidos fijados mediante perfusión. A continuación se extrajeron los cerebros y se procesaron para inmunodetección del BrdU.

Ensayos de comportamiento con animales

El *Tightrope* test o el test de cuerda, (Matheu et al. 2007) es un test que permite determinar la coordinación neuromuscular del animal mediante el estudio de la capacidad que tienen estos para mantenerse sobre una cuerda. Para ello se coloca al animal en medio de una cuerda de 60 cm de largo y 1cm de diámetro, y se considera superada cuando el ratón se mantiene en equilibrio durante 60 segundos. Los animales tienen una media de 5 oportunidades para lograr pasar la prueba.

El otro test empleado es el del laberinto elevado en cruz o Elevated Plus Maze (EMP) que incluye un aparato compuesto por dos brazos abiertos, dos brazos cerrados y un área central, que se encuentra elevado por encima del suelo. El animal es colocado en el centro del aparato y se le permite la exploración durante 15 minutos, tomándose como índice de medida de ansiedad a la menor entrada en los brazos abiertos.

Líneas celulares y su cultivo

Las diferentes líneas celulares utilizadas a lo largo de esta tesis, así como el tipo celular al que pertenecen, su origen y medio de cultivo empleado, se especifican en la Tabla 3.

Línea celular	Tipo celular	Origen	Medio de cultivo
HUMANAS			
HEK 293T	Fibroblastos	Riñón	DMEM+10% FBS
T98G	Glioma	Glioblastoma	DMEM+10% FBS
U87MG	Glioma	Astrocitoma	DMEM+10% FBS
U373MG	Glioma	Glioblastoma	DMEM+10% FBS
GNS166	Glioma Neural Stem	Glioblastoma	DMEM/F12
GNS179	Glioma Neural Stem	Glioblastoma	DMEM/F12
MURINAS			
SVZ NSCs	Células Madre Neurales	Cerebro	DMEM/F12
MEFs WT	Fibroblastos Embrionarios Murinos	Embriones murinos WT	DMEM+10% FBS
MEFs Z/SOX9	Fibroblastos Embrionarios Murinos	Embriones murinos Z/Sox9	DMEM+10% FBS
MEFs Sox9 ^{flox7flox}	Fibroblastos Embrionarios Murinos	Embriones murinos Sox9 ^{flox7flox}	DMEM+10% FBS
MEFs L2AcKO	Fibroblastos Embrionarios Murinos	Embriones murinos Z/Sox9	DMEM+10% FBS
SOX2-GFP	Células Madre Neurales	Cerebro	DMEM/F12

Tabla 3. Características de las líneas celulares utilizadas. El medio DMEM suplementado además de 10% FBS, con 2 mM de glutamina, 45 g/ml penicilina/estreptomicina. El DMEM/F12 con glucosa 45%, B27 10x, N2 100x y 20ng/ul de factores FGF y EGF. ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo. MEFs: Fibroblastos embrionarios murinos.

Las líneas celulares adherentes T98G, U87, U373 junto con los MEFs, se cultivaron en medio DMEM (Medio de cultivo *Eagle* modificado por Dulbecco) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2mM de glutamina y penicilina (50000IU/ml) y estreptomicina (500µg/ml). Las líneas celulares de carácter célula madre se cultivaron en medio DMEM/F12 (Medio de cultivo *Eagle* modificado por Dulbecco, Ham F12) en proporción 1:1 suplementadas con B27 10x (Gibco) N2 100x (Gibco), glucosa 45% y 20 ng/ul de factores de crecimiento epitelial (EGF, Sigma Aldrich) y de fibroblastos (bFGF, R&D Systems). Las células de la SVZ se cultivaron en suspensión en

placas sin tratar mientras que las GNS se cultivaron en adhesión previo tratamiento de la superficie con 10 µg de laminina (Sigma Aldrich) durante 3 horas.

Las células adherentes fueron subcultivadas cada 2-3 días mediante tratamiento con tripsina/EDTA (Sigma Aldrich). Por su parte, los cultivos de neuroesferas (primera generación de neuroesferas o neuroesferas primarias) fueron sometidos a disgregación enzimática mediante acutasa (Gibco) tras 10 días de cultivo, y subcultivadas en pocillos de 9.6 cm² a una densidad de 10.000 células por pocillo en las mismas condiciones que las primarias durante otros 10 días, formándose las denominadas neuroesferas secundarias. Todas las líneas celulares se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar de 37 °C de temperatura, 95% de humedad, 21% de O₂ y 5% de presión de CO₂. Todas las manipulaciones se hicieron en una campana de flujo laminar de seguridad Clase II (nivel de seguridad biológica 2; Class II Biohazard Safety Cabinet, ESCO).

Para su almacenamiento a largo plazo, las células se conservaron en un contenedor de nitrógeno líquido, en criotubos de 2 ml, en su medio de cultivo normal con 10% de FBS y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

Generación de fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) y condiciones de cultivo

Los fibroblastos embrionarios murinos (MEF) se generaron a partir de embriones de ratones hembras C57BL/6 puro, Z/Sox9, Sox9^{flox} y L2AckO en día 13,5 post-concepción (E13,5), salvo para los Z/SOX9 que fue en día 12.5. Se lavó el útero en una solución de PBS y antibiótico (penicilina-estreptomicina) precalentado a 37°C, y se procedió a la separación de cada uno de los embriones del saco vitelino, eliminándose los órganos (cabeza y vísceras). El resto de cada embrión se recogió individualmente en placas de 60 mm de diámetro y fue sometido a una primera disgregación mecánica con la ayuda de un bisturí estéril, y a continuación a una disgregación enzimática por tratamiento de cada embrión con 1 ml de solución de tripsina-EDTA 2X (diluida de una solución stock 10X, Gibco), durante 20 minutos a 37°C en un incubador de CO₂. Transcurrido este tiempo, se disgregó la suspensión celular pipeteando varias veces con una pipeta Pasteur y se incubó a 37°C en el incubador otros 20 minutos más. Posteriormente, se añadió 10 ml de medio completo, con ayuda de la pipeta se terminó con la disgregación mecánicamente y se pasó toda la solución con las células disgregadas a un frasco de cultivo de 75-cm². Se incubaron las células a 37°C, al día siguiente se cambió el medio y se dejaron crecer hasta confluencia. Cuando el cultivo alcanzó el 70% de confluencia (2-3 días después) las células se tripsinizaron, se transfirieron a un frasco de 150 cm² y se mantuvieron a

Materiales y métodos

37°C hasta confluencia. En este momento, se congelaron 3-4 millones de células por vial y una vez congeladas, los viales se transfirieron a un tanque de nitrógeno líquido. Se consideró pase uno de estas células el momento en que fueron puestas en cultivo después de la descongelación.

Estas células primarias fueron cultivadas en DMEM completo a 37 °C de temperatura, 95% de humedad, 5% de presión de CO₂ y 21% O₂.

Ensayos de proliferación y auto-renovación de las células madre adultas

Las neuroesferas provenientes de ratones de diferentes edades y genotipos se disgregaron a día 10 tras su extracción, se contaron, y se sembraron a una densidad de 10.000 células por pocillo por triplicado en placas de 9.6 cm² no tratadas. Estas células se dejaron crecer durante 10 días, añadiéndoles 0.5 ml de medio fresco cada 3 días. Al cabo de 10 días, se contaron el número de esferas totales. Una vez realizado el conteo, se procedió a analizar la capacidad de auto-renovación de estas células, para lo que las esferas se disgregaron y se volvieron a sembrar a la misma densidad en placas p6 no tratadas. Se mantuvieron en cultivo durante 10 días tras lo cual se procedió nuevamente al conteo.

Plásmidos y cepas bacterianas

Los plásmidos empleados en este trabajo, así como su procedencia, se recogen en la Tabla 4.

Éstos plásmidos se multiplicaron en la cepa *E. coli* DH5α y se crecieron con agitación constante en medio LB a 37°C a lo largo de 16 horas.

Plásmido	Descripción	Procedencia
pWPXL GFP	Plásmido control	Addgene (#12257)
pWPXL SOX9	Plásmido de sobre-expresión de SOX9	Addgene (#36979)
pLXSN	Plásmido control	(Sanchez-Perez et al. 2000)
pLXSN CL100	Plásmido de sobre-expresión de MKP1	(Sanchez-Perez et al. 2000)
Promotor Lamp2a + luciferasa	Gen reportero que contiene las secuencias que codifican el dominio de un área del promotor de LAMP2A seguido de un cassette de expresión de luciferasa	(Valdor et al. 2014)

Renilla	Plásmido del promotor de CMV seguido del gen renilla	(Valdor et al. 2014)
mCherry-GFP LC3	Plásmido reportero de macroautofagia (Figura 5)	Addgene (#22418)
KFERQ Dendra	Plásmido reportero de la autofagia mediada por chaperonas (Figura 5)	(Koga et al. 2011)

Tabla 4. Características de los plásmidos utilizados.

Los dos plásmidos reporteros de autofagia (KFERQ Dendra y mCherry-GFP-LC3) se basan en la interacción del sustrato a degradar con el lisosoma para el marcaje en el caso de Dendra, la proteína degradada por CMA, y en el caso de mCherry, la maduración de los autofagosomas en autofagolisosomas dentro de la macroautofagia (Figura 6).

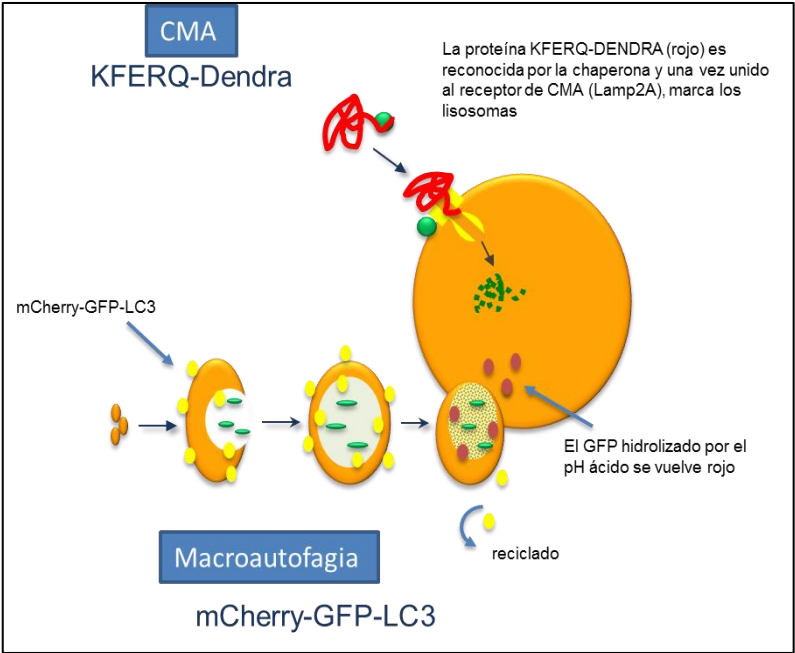


Figura 6. Explicación del funcionamiento de los plásmidos KFERQ-Dendra y mCherry-GFP-LC3. Imagen cedida por el laboratorio de la Dra. Ana María Cuervo.

Transfección de células

Para la transfección el día previo se sembraron 3×10^6 células de HEK 293T en placas de 100mm. El día de la transfección, se agregaron en un tubo eppendorf 2µg de DNA en 250 uL de medio Optimem (Gibco) y en otro tubo, 10 uL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en 250 uL de medio Optimem (Gibco). Se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se mezcló el contenido de ambos tubos (DNA + Lipofectamina) y se

dejó incubar durante 20 minutos. Durante este tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo de la placa con HEK 293T y se lavó con PBS 1X. Luego, se agregaron 4,5 mL de medio Optimem. Pasados los 20 minutos de incubación, se agregaron los 500 uL de la mezcla DNA/Lipofectamina a la placa y se incubó a 37°C y 5% CO₂ durante 6 horas. Transcurrido este tiempo se retiró el medio Optimem, se lavaron las células con PBS 1X y se agregó 5 mL de medio de cultivo completo (DMEM suplementado con 10% FBS).

Infección de células

Para la infección de las NSC, el día previo a la infección se sembraron 1x10⁵ células provenientes de la zona subventricular de diferentes tipos de ratones (pase temprano de ratones adultos, envejecidos y pase alto de ratones jóvenes), en placas de 9.6 cm².

Transcurridas 24 horas se realizaron las infecciones usando los lentivirus portadores de los plásmidos pWPXL GFP y pWPXL SOX9 generados en la Plataforma de Vectores Virales de Inbiomed. La cantidad de virus utilizada fue siempre de 10 unidades infectivas por células (M.O.I. 10) y se empleó polibreno a una concentración final en el medio de 2µg/mL.

Por otro lado, para la infección de las líneas celulares adherentes se sembraron 2x10⁵ en placas de 60mm de diámetro y en este caso, se infectaron mediante retrovirus portadores de los plásmidos pLXSN y pLXSN CL100 empleando una M.O.I. 10. En ambos casos a las 6 horas posteriores a la infección se retiró el medio que contenía las partículas víricas y se añadió medio fresco.

La infección de los dos reporteros de autofagia (MA y CMA) se realizó de la misma manera que la descrita con otros plásmidos, pero en este caso los lentivirus fueron generados en el laboratorio mediante transfección de la línea celular 293T.

Reactivos y agentes quimioterápicos

Los diferentes fármacos y reactivos biológicos utilizados en los diferentes experimentos de esta memoria, así como su abreviatura, procedencia y concentración de trabajo, se detallan en la Tabla 5.

Fármaco/Reactivo	Abreviatura	Concentración de trabajo	Proveedor	Número de catálogo
PH797804	PH	1 µM	Selleckchem	S2726
4-hidroxitamoxifeno	4OHT	1 mM	Sigma Aldrich	H7904
Cloruro de amonio	NH ₄ Cl	20 mM	Sigma Aldrich	A9434
Leupeptina	Leu	0.1 mM	Sigma Aldrich	L2884

Mg132	Mg132	4 μ M	Sigma Aldrich	M8699
OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit	OxyBlot		Millipore	S7150
Paraquat	PQ	0.5 mM	Sigma Aldrich	36541
Etopósido	Etopo	10 μ M	Sigma Aldrich	E1383
Tapsigargina	Tg	0.5 mM	Sigma Aldrich	T9033
Ácido Oléico	Ac. Ole	0.1 mM	Sigma Aldrich	O1008

Tabla 5. Características de los reactivos biológicos y fármacos utilizados. μ g/ml: microgramos/mililitro; μ M: microMolar; U/ml: unidades/mililitro

Tratamientos de líneas celulares

Para los experimentos realizados con líneas celulares en adhesión, se sembraron 1×10^5 células de cada línea en placas de 60 mm y 24 horas después, cuando las células alcanzaban una confluencia de 70-80%, se trataron las células con el correspondiente fármaco o reactivo durante el tiempo estipulado en cada caso. En el caso de líneas en suspensión (neuroesferas), se sembraron 5×10^3 células en pocillos de 9.6 cm² y a las 24 horas se procedió a los tratamientos. Inmediatamente después de cada tratamiento, se extrajo proteína y/o ARNm total como se indica en los siguientes apartados.

Medida de ROS celulares

Las células son incubadas con la sonda 2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), (10 μ M, Sigma) que cuantifica la cantidad de H₂O₂ celular, es de composición apolar y tiene la capacidad de atravesar la membrana plasmática. Una vez dentro es hidrolizada por la esterasas de la célula a diclorofluorescina (DCFH) que en presencia de H₂O₂, se convierte en su forma fluorescente (DCF) y se mide por citometría.

Medida de expresión génica

Muestras de pacientes

En este trabajo se han utilizado un total de 95 biopsias de glioma, de las cuales 2 son gliomas de primer y segundo grado, 13 corresponden a gliomas de grado III y 71 son del tipo Glioblastoma Multiforme. Parte de las muestras proceden de pacientes que se sometieron a

cirugía en el Hospital La Fe de Valencia (n=44), y parte en el Hospital Donostia de San Sebastián (n=27). Tras la recogida de muestras inmediatamente se congelaron a -80°C. El Departamento de Patología del Hospital La Fe de Valencia, así como el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Donostia examinaron y determinaron las características histopatológicas de cada muestra.

Extracción de ARN total procedente de tejido humano y de líneas celulares

Para la extracción del ARN total de las muestras clínicas se partió de tejido congelado del que se extrajo el ARN mediante la técnica de trizol. También se utilizó esta técnica para la extracción de ARN total de las líneas celulares. Este método se basa en el compuesto trizol (Invitrogen) y el protocolo es el propuesto por el fabricante con modificaciones. Para las muestras de pacientes, se homogeneizó el tejido, previamente congelado con nitrógeno líquido para evitar cualquier reacción biológica, en un tissue-lyser (Quiagen). Aproximadamente 100 mg de material triturado se transfieren a un tubo, añadiéndose 750 µl de trizol y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para las líneas celulares se añadió directamente el trizol al tubo donde habían sido recogidas las células. A continuación se añadió 1/5 del volumen total de Cloroformo, se agitó 15 segundos al vórtex, se dejó reposar 2 minutos y finalmente se centrifugó en frío 15 minutos a 12.000 g. De las dos fases resultantes se transfirió la superior (fase acuosa) a otro tubo, donde se añadió el mismo volumen de alcohol isopropílico para precipitar el ARN. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y después se centrifugó en frío a 12.000 g durante 10 minutos. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol al 70%, centrifugándose después a 7.500 g en frío durante 5 minutos. Finalmente se eliminó el etanol y se secó el pellet en una bomba de vacío, para después poder disolverlo en agua bidestilada.

La cuantificación del ARN total aislado se estimó partir de una alícuota 1 µl de muestra mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop ND2000.

Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR)

Para la obtención del ADN complementario de cadena simple (ADNc), se retro-transcribió entre 0.5 y 2 µg de ARN procedente de los tejidos de muestras de pacientes y de las líneas

celulares usando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems-ABI). Esta reacción se realizó utilizando cebadores de secuencia aleatoria (random primers, Applied Biosystems-ABI) en un volumen total de 20 μ l. El protocolo de la reacción es 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 120 minutos y 85°C durante 5 minutos.

Para determinar la expresión de los diferentes genes se utilizó la qRT-PCR. Cada ADNc se analizó por duplicado utilizando el termociclador 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems-ABI). La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 12 μ l que contenía 5 μ l de solución de ADNc (correspondiente a 20 ng de ARN total), 6 μ l de la mezcla Sybr Green Expression Master Mix (Applied Biosystems-ABI) y 0,75 μ l de los primers (*forward* y *reverse*) de cada uno de los genes humanos y murinos indicados en la Tabla 6.

Como genes control interno adicionales se incluyeron el gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la β -actina.

Gen	Secuencia <i>Forward</i> (5'-3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'-3')
HUMANO		
GAPDH	ATGGGGAAGGTGAAGGTCGG	GACGGTGCCATGGAATTTGC
SOX9	AGCGAACGCACATCAAGAC	CTGTAGGCGATCTGTTGGGG
SOX2	TACAGCATGTCCTACTCGCAG	GAGGAAGAGGTAACCAAGGG
p16	GGGGGCACCAGAGGCAGT	GGTTGTGGCGGGGGCAGTT
MKP1	CCTGTCCACTCCACGAACAGT	GCTGGGAGAGGTCTGAATGG
Tuj1	GCGAGATGTACGAAGACGAC	TTTAGACACTGCTGGCTTCG
CNPase	TTCTGGAGATGAACCCAAGG	TCTCTTACCACCTCTGCT
LAMP2A	TGACGACAACCTCCTTGTC	AGCATGATGGTCTTGAGAC
MURINO		
Actin	GGCACCACACCTTCTACAATG	GTGGTGGAAGCTGTAGCC
Sox9	AGCTCACCAGACCCTGAGAA	CTCCAGCAATCGTTACCTTC
Sox2	TAGCACTTGTGCCAGAACG	AAGCCGCTGTTCTCTTTCC
GFAP	ATCCGCTCAGGTCATCTTACCC	TGTCTGTCTAATGTCTTCCCTACC
p16	GCCCAACGCCCCAACTCTTTC	GCGACGTTCCAGCGGTACACA
p19	GCCGCACCGGAATCCT	TTGAGCAGAAGAGCTGCTACGT
Sesn1	CCAGGTAGGAACACTGATGC	GTCTGGATAACATCACATTAG
Sesn2	CTCACAGCTGGTCTGTGTG	CCTCCGTGTGGCAATACC
GPX	GACATCAGGAGAATGGCAAG	CATCACCAGCCAATACCAG
MnSOD	CGTCGTCCACACATCAATC	TGAACGTCACCGAGGAGAAG
Tuj1	CCCAGCGCAACTATGTAGG	CCAGACCGAACACTGTCCA
CNPase	CATCCTCAGGAGCAAAGGAG	TGAATAGCGTCTTGCACTCG
Lamp2a	AGGTGCTTTCTGTGTCTAGAGCGT	AGAATAAGTACTCTCCAGAGC TGC
Atg7	TAATAGTGCCCTGGACG	GCAGAGTCACCATTTAGTA
Beclin	TGGATTACTAGAGGCAGAAT	TTGTCCTAGAACAGAACCTT

Tabla 6. Primers utilizados en las reacciones de Q-RT-PCR.

La cuantificación relativa de la expresión de los genes se calculó mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que consiste en calcular la expresión normalizada del gen de estudio en la muestra problema con respecto a la expresión normalizada del mismo gen en la muestra de referencia. Los datos se presentan como el “cambio en veces de expresión” del gen diana normalizado con un gen de referencia y relativo a una muestra control. Se obtuvieron los valores de umbral de ciclo (Cycle threshold; Ct) para cada gen control en cada muestra y se transformaron en cantidades por el método comparativo Ct. Estos valores fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen de interés en la muestra denominada en cada caso como “control”.

Ensayo de la actividad luciferasa

La regulación transcripcional del gen Lamp2a por el factor de transcripción SOX9 se cuantificó mediante la medida de la actividad del gen reportero luciferasa precedido de una secuencia del promotor de Lamp2a. De esta manera, se co-transfectaron 2 µg de tres plásmidos en las células 293T: el plásmido de sobre-expresión de SOX9, el plásmido portador del gen reportero de la luciferasa precedido del promotor de Lamp2a, y el plásmido del promotor de CMV seguido del gen renilla-luciferasa. Este último es utilizado como control de actividad luciferasa basal al estar precedido de un promotor de expresión constitutiva.

Después de tratar las células con Paraquat (200 µM) durante 6 horas, se lisaron con el tampón comercial Passive Lysis Buffer (Promega). Con 30 µl del extracto se cuantificó la actividad luciferasa utilizando los reactivos LAR II y Stop & Glo del kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega), según las instrucciones del manual usando un luminómetro Berthold.

La actividad luciferasa se expresó por microgramo de proteína y se normalizó con la luminiscencia de la renilla en el mismo extracto. En las gráficas se muestra la actividad relativa de luciferasa considerándose los niveles de actividad luciferasa detectados con la transfección del vector que contiene únicamente el gen reportero luciferasa.

Extracción y cuantificación de proteínas

Para la extracción de proteína total procedente de líneas celulares, las células se recogieron y se lavaron 2 veces con PBS 1X. Los pellets se lisaron en 100 µL de tampón de lisis (1% NP-40, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 30 mM Na₄P₂O₇, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM Tris-HCl pH 7.4). Se añadió una mezcla de inhibidores de proteasas comercial (Sigma-Aldrich) en una relación de 1 µL de mezcla por cada millón de células, y se mantuvieron en hielo durante 30 minutos para que se realizara la lisis. Posteriormente, los lisados se centrifugaron a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C para precipitar el material no solubilizado. Los sobrenadantes de la

centrifugación constituyeron los extractos de proteínas cuyo contenido se cuantificó por el método del ácido bicincomínico (BCA, Thermo Scientific), según las instrucciones del fabricante, utilizando como control para la recta patrón la albumina sérica bovina (BSA).

Western Blot

El análisis de expresión de proteínas endógenas así como los cambios en la fosforilación de proteínas endógenas se llevó a cabo mediante la técnica de western blot. Después de determinar la cantidad de proteína apropiada se tomó el volumen correspondiente a los microgramos de proteína deseados (generalmente 20 µg) y se le añadió una quinta parte de tampón de carga 5x (312.5 mM Tris pH 6.8, 10% SDS, 50% glicerol, 0.5% (p/v) azul de bromofenol y 5% β-Mercaptoetanol). Las muestras fueron incubadas durante 5 minutos a 95°C para la completa desnaturalización de las proteínas. La separación de las proteínas por tamaño se realizó mediante SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrilamide Gel Electrophoresis) empleando el sistema Mini protean 3 de BioRad con una concentración dependiente del tamaño de la proteína a detectar del 8, 10 o 15% en tampón de electroforesis. Los geles se corrieron a 120mV durante 2 horas. Las proteínas separadas en los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) mediante transferencia en húmedo (300 mA, 90 minutos en tampón de transferencia) y se comprobó la transferencia de las proteínas a la membrana con Rojo Ponceau S (Sigma). Las membranas se bloquearon en 5% leche desnatada (Sigma) o 5% BSA (Sigma) disuelto en tampón tris salino (TBS) con 0,05% de Tween 20 (TBST) durante 60 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario durante 2 horas a temperatura ambiente o 15 horas a 4°C. Posteriormente, tras lavados con TBST, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa durante 45 minutos a temperatura ambiente. Los inmunocomplejos se visualizaron utilizando el sistema de quimioluminiscencia ECL Western Blotting Luminol Reagent (Invitrogen) como se indica en el manual de instrucciones. Los niveles de proteína se relativizaron a la intensidad del control de carga utilizado (actina). Los diferentes anticuerpos primarios y secundarios utilizados en esta memoria, así como su origen, clonalidad, aplicación y procedencia se detallan en las Tablas 7 y 8 respectivamente.

Anticuerpo	Especie	Aplicación	Proveedor	Número de catálogo
β-actina	Ratón	WB (L.C./M)	Sigma-Aldrich	A5441
Sox9	Conejo	WB (L.C./M)/IF	Millipore	AB571
Sox2	Conejo	WB (L.C./M)/IF	Millipore	AB5603
P-H3	Ratón	WB (L.C./M)/IF	Abcam	AB5176
p16	Ratón	WB (L.C./M)/IF	Abcam	AB51243
Tuj1	Ratón	IF	Covance	MMS-435P
CNPase	Ratón	IF	Millipore	AB9342
GFAP	Ratón	IF	Sigma	G3893
Pp38	Conejo	WB (L.C./M)	Cell Signalling	4511
p38	Conejo	WB (L.C./M)	SantaCruz Biotechnology	sc-7972
LC3B	Conejo	WB (L.C./M)	Sigma	L7543
P62	Conejo	WB (L.C./M)	Enzo Life Science	BML-PW9860- 0025
LAMP2A	Conejo	WB (L.C./M)	Invitrogen	51-2200
GFP	Cabra	WB (L.C./M)	Abcam	AB13970

Tabla 7. Características de los anticuerpos primarios utilizados. WB: western blot; IF: Inmunofluorescencia; IHQ: Inmunohistoquímica; (L.C): Línea celular; (M): MEF.

Anticuerpo	Especie	Aplicación	Proveedor
Donkey Anti-Goat IgGHRP	Mono	WB (L.C./M)	Santacruz Biotechnology
Goat Anti-Mouse IgGHRP	Cabra	WB (L.C./M)	Santacruz Biotechnology
Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)-HRP Conjugate	Cabra	WB (L.C./M)	Santacruz Biotechnology
Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG (H+L)	Cabra	IF	Invitrogen
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Cabra	IF	Invitrogen

Tabla 8. Características de los anticuerpos secundarios utilizados. WB: western blot; IF: Inmunofluorescencia; IHQ: Inmunohistoquímica; (L.C): Línea celular; (M): MEF.

Para el análisis de proteínas oxidadas se utilizó el kit OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit (Promega) para lo que se siguió el procedimiento indicado en las instrucciones del manual.

Inmunofluorescencia (IF)

Para los experimentos de inmunofluorescencia los protocolos se pueden dividir en dos en función del estado de diferenciación de la línea celular. Para las líneas no diferenciadas, estas se sembraron en su propio medio DMEM/F12 pero sin factores de crecimiento sobre cubreobjetos pre-tratados con laminina, mientras que las líneas diferenciadas se sembraron en su medio DMEM+10% FBS sobre cubreobjetos sin necesidad de tratamiento. Las células fueron incubadas con este medio específico durante 7 días.

Las muestras fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y tras 3 lavados con PBS 1X, se incubaron a lo largo de 1 hora con una solución bloqueante (SBF al 10% en PBS con 0,3% de Triton X-100). Tras el bloqueo, las muestras fueron incubadas con un anticuerpo primario durante 2 horas a temperatura ambiente y, después de un lavado intensivo (3 lavados de 5 minutos con PBS 1X), se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.). Pasada una hora de incubación y después de otro lavado intensivo, las muestras se contrastaron con DAPI y fueron montadas sobre portaobjetos con medio de montaje Vectashield (Palex). La inmunofluorescencia de las muestras se valoró en un microscopio de fluorescencia modelo Nikon Eclipse 80i.

Para el ensayo con los reporteros de autofagia 500 células infectadas con estos plásmidos fueron directamente sembradas en placas de 96 pocillos y tras 24 horas se fijaron con paraformaldehído al 4% y se incubaron durante 10 minutos. Tras fijarlas las muestras fueron lavadas con PBS y observadas gracias a los sistemas de High Content Analysis (HCA) y High Content Screening (HCS) proporcionados por el Albert Einstein College of Medicine.

Inducción de tumores subcutáneos in vivo en ratones

Para la inducción de tumores subcutáneos se inocularon subcutáneamente 100.000 células de la línea U373 y U373 sobre expresada con MKP1 en 100µl de PBS 1x en los 4 flancos de ratones Nude (n=1 para U373, n=1 para U373 pLXSN y n=3 para U373 sobre-expresado con MKP1). El volumen tumoral fue medido 3 veces por semana desde su aparición visible (volumen inicial 0,014 cm³) calculándose según la ecuación $V = (l \cdot w^2 \cdot 0,52)$, donde l es el diámetro mayor del tumor y w el diámetro menor. Los ratones fueron sacrificados cuando el volumen del tumor en el flanco alcanzó los 2,5-3 cm³.

Inducción de GBM in vivo mediante inyección esterotáxica en ratones

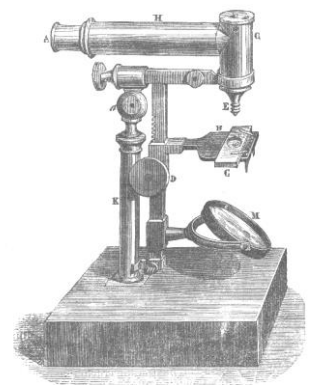
Para inducir la formación de tumores cerebrales *in vivo* se inyectaron 100.000 células de la línea GNS166 control y GNS166 sobre expresada con MKP1 en 1 μ l de PBS 1x a una velocidad de 0.05 μ l/minuto, en el estriado del hemisferio izquierdo de ratones machos adultos NOD/SCID (n =3 por grupo). Los animales fueron anestesiados con isoflurano y las coordenadas utilizadas en el aparato estereotáxico (Kopf Instruments) fueron Bregma: +1,0 mm posterior, -2 mm lateral izquierdo y -2.5 mm de profundidad, de acuerdo con el protocolo del Dr. Pollard (Pollard et al. 2009). La generación y/o progresión del tumor generado por las células GNS166 fue seguido mediante estudios de comportamiento de los animales como por ejemplo la medida de pérdida de peso o el test de “paso a paso” en el que se mide la capacidad del animal a andar sobre sus dos patas delanteras. En el momento en el que los ratones mostraban signos de presencia de tumor fueron sacrificados y con estos datos se realizó una curva de supervivencia.

Todos los ensayos fueron realizados siguiendo la directiva 86/609/EEC del Consejo de la Comunidad Europea. Se prestó especial atención en minimizar el sufrimiento animal.

Análisis estadístico

Los datos que se muestran son la media \pm la desviación estándar (S.D) de al menos tres experimentos independientes. Para el análisis de los datos obtenidos de los ensayos con ratones, las comparaciones de medias entre variables continuas se realizaron utilizando el test t de *Student* para distribuciones normales. Valores de p menores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS



1. Determinación de la expresión de SOX9 con el envejecimiento

La expresión de SOX9 disminuye con el envejecimiento de las NSC de ratón in vivo

Se procedió a la comparación de la expresión de SOX9 en la zona subventricular (SVZ) de ratones de la cepa C57Bl/6 jóvenes (de 2 meses de edad) y envejecidos (de 24 meses de edad). Para ello se sacrificaron animales de dicha edad y sus tejidos fueron fijados mediante perfusión. Se obtuvieron cortes de la SVZ del cerebro y se procedió a la inmunodetección de SOX9 mediante microscopía confocal. Se muestra en la figura 7A cómo el número de células positivas para SOX9, así como su intensidad, disminuye de forma significativa en ratones envejecidos, donde se observa una media de 10 células SOX9⁺ mientras que en los jóvenes esta media está por encima de 35 células. Este mayor número de células SOX9⁺ en la SVZ de ratones jóvenes se correlaciona con una mayor expresión a nivel transcripcional en dicha zona. Esto también se observa en los otros dos nichos propios de células madre, el bulbo olfatorio y el giro dentado. En todos los casos la expresión de Sox9 resultó disminuir entre 40 y 60% en los ratones envejecidos respecto a los jóvenes, siendo en los tres casos las diferencias estadísticamente significativas (Figura 7B).

Para asociar la expresión de SOX9 con el número de células madre presente en la SVZ se procedió a la inyección intraperitoneal de BrdU en ratones jóvenes y envejecidos durante 7 días consecutivos. Al cabo de 4 semanas se seccionaron los cerebros y se realizó una inmunodetección para BrdU y SOX9. Se determinó (Figura 7C), como han descrito otros grupos previamente (Maslov et al. 2004), que el número de células positivas para BrdU disminuye en la SVZ de ratones envejecidos, y que además las células positivas para BrdU también lo son para SOX9, cuya intensidad de expresión es inferior en ratones envejecidos respecto a los jóvenes. Estos datos en conjunto confirman que la expresión de Sox9 disminuye con la edad en distintas regiones del cerebro y que la expresión de SOX9 correlaciona con el envejecimiento de las NSC *in vivo* ya que a medida que se produce el agotamiento de éstas con la edad, la expresión de SOX9 disminuye. Por último, nuestros datos sugieren que el descenso de SOX9 es un biomarcador del envejecimiento de las NSC ya que las células BrdU positivas continúan siéndolo también para SOX9.

Resultados

Para extender el estudio de SOX9 con el envejecimiento de las NSC, caracterizamos su expresión en el modelo de neuroesferas *in vitro*. Para ello, se extrajo el tejido de la zona SVZ de ratones de la cepa C57Bl/6 jóvenes (2 meses de edad) y envejecidos (24 meses de edad) y se cultivó en un medio selectivo para células madre (descrito en el apartado de Materiales y métodos). Se realizaron diferentes tipos de ensayos que se detallan a continuación.

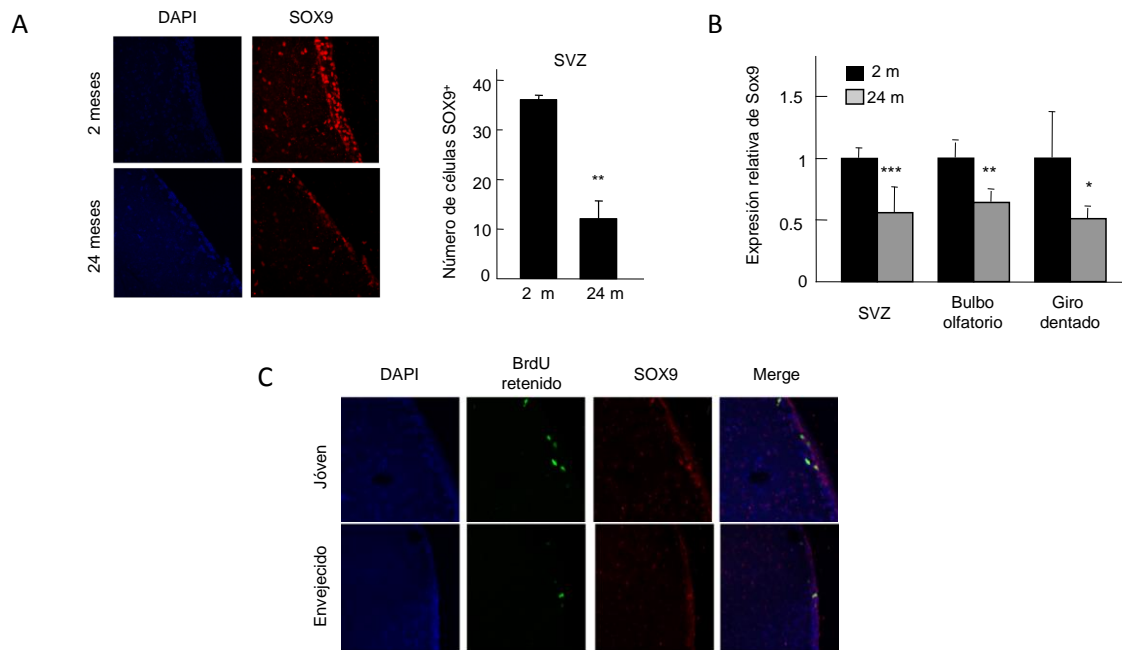


Figura 7. La expresión de SOX9 disminuye con el envejecimiento de las NSC *in vivo*. (A) Imagen representativa del ensayo de expresión de SOX9 mediante IF en la SVZ de ratones jóvenes y envejecidos. A la derecha, cuantificación de la expresión de SOX9. Cada barra representa el promedio del número de células positivas para SOX9 y el EEM de experimentos independientes (n=3). (B) Expresión de SOX9 en el tejido de los tres nichos de células madre (SVZ, bulbo olfatorio y giro dentado) a nivel de ARNm. (C) Fotografías representativas del ensayo de inmunodetección de BrdU retenido (verde) y SOX9 (rojo) en la SVZ de ratones jóvenes y envejecidos. Test *t* de Student. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

La disminución en la capacidad de proliferación y auto-renovación está asociada a una menor expresión de Sox9 y Sox2 *in vitro*

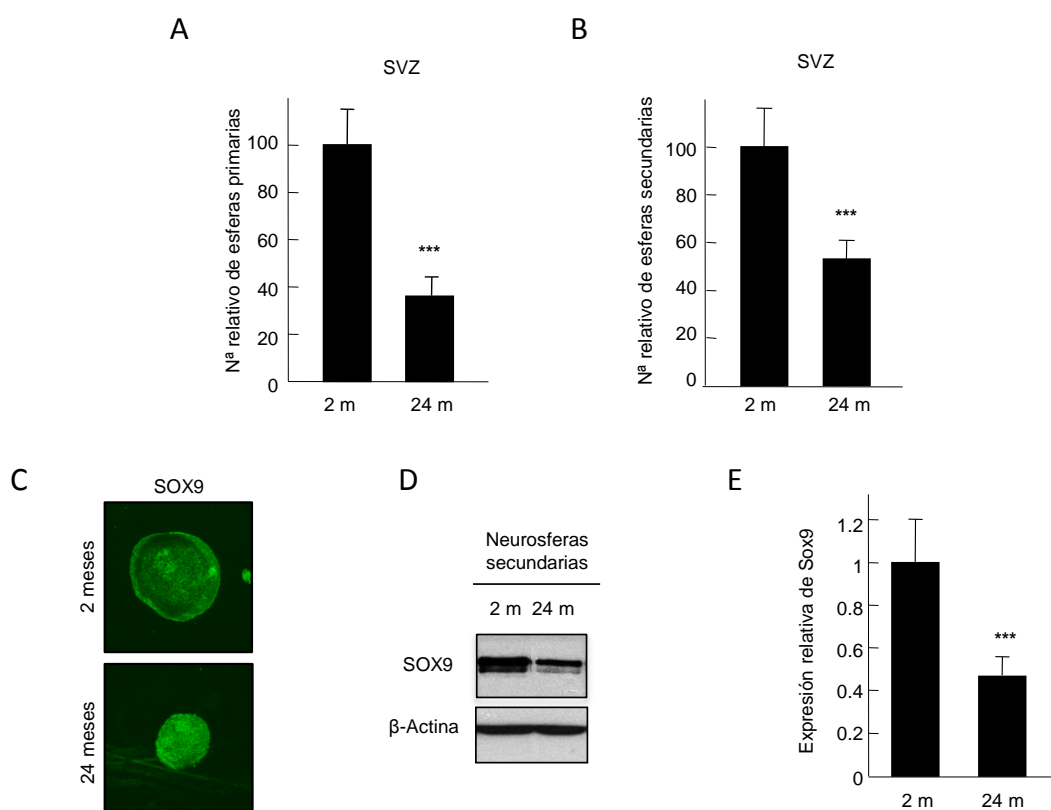
Se sembraron células procedentes de la SVZ de ratones jóvenes y envejecidos al cabo de 10 días se procedió al conteo del número total de neuroesferas primarias. Se observó que el número de éstas provenientes de ratones jóvenes era un 60% mayor que las de ratones envejecidos (Figura 8A). Tras la formación de las esferas primarias, se llevó a cabo el proceso de disgregación y siembra de cada condición y se procedió al conteo de las esferas secundarias tras 10 días. El efecto fue similar al observado en las primarias siendo el número de

neuroesferas secundarias formadas a partir de ratones jóvenes significativamente mayor y de diámetro mayor que en los ratones envejecidos (Figura 8B, C).

Con el objetivo de caracterizar las neuroesferas de estos ratones, se analizó la expresión de Sox9 a nivel de proteína mediante western blot (Figura 8D) y a nivel de y ARNm mediante qRT-PCR (Figura 8E). Tanto los niveles de proteína como los de ARNm de Sox9 disminuyen en las neuroesferas secundarias de ratones envejecidos, aunque la mayor parte de las células siguen expresando SOX9 (Figura 8C). Los niveles de ARNm de Sox9 disminuyen un 55% siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

Además de Sox9, se estudiaron los niveles de Sox2, comúnmente establecido como marcador de célula madre neural (Arnold et al. 2011; Pevny & Nicolis 2010). Se determinaron estos valores a nivel de proteína (Figura 8F) así como a nivel de de ARNm mediante RT-qPCR (Figura 8G). Tanto los niveles de proteína como los de ARNm de Sox2 disminuyen en las neuroesferas secundarias de ratones envejecidos, siendo esta disminución de un 60% y estadísticamente significativa.

Estos datos confirman lo publicado por otros grupos y observado *in vivo*, y demuestran que también *in vitro* existe un descenso en el número de las NSC con el envejecimiento y que este está asociado a un descenso en la expresión de SOX9 así como de SOX2.



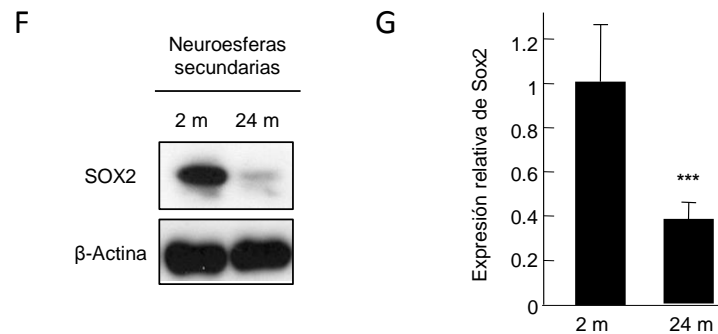


Figura 8. El envejecimiento de las NSC disminuye la capacidad de proliferación y auto-renovación y está asociado a una disminución de la expresión de SOX9. (A, B) Ensayo de la capacidad de formación de neuroesferas primarias y secundarias. Cada barra representa el promedio del número de esferas relativo a la condición joven y el EEM de experimentos independientes (n=3). (C) Fotografías representativas de niveles más bajos de SOX9 en NCS provenientes de ratones envejecidos.. (D) Comparativa de los niveles de expresión de SOX9 de NSC jóvenes y envejecidas a nivel de proteína mediante western blot. (E) Análisis de la expresión de ARNm de Sox9 por qRT-PCR. (F) Comparativa de los niveles de expresión de SOX2 de neuroesferas jóvenes y envejecidas a nivel de proteína mediante western blot. (G) Análisis de la expresión de Sox2 a nivel de ARNm. Los niveles del ARNm fueron normalizados con los niveles del mensajero del gen que codifica para la β -Actina y fueron referidos a los niveles de las NSC jóvenes. En los western blot los niveles de la β -Actina se emplearon como control de carga. Las barras representan la media de los resultados y el EEM (n=4). Test t de Student. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Validación mediante un modelo generado *in vitro*: envejecimiento por pases seriados

La expresión de SOX9 disminuye con los pases en cultivo en NSC C57Bl/6

El cultivo seriado induce una serie de alteraciones morfológicas y moleculares que se observan con el envejecimiento y se puede considerar un modelo de envejecimiento *in vitro* (Wagner et al. 2008). Además del modelo comparativo de envejecimiento por edad (ratones jóvenes y ratones envejecidos), se generó un modelo de envejecimiento *in vitro* por pases seriados en cultivo en a partir de neuroesferas procedentes de la cepa C57Bl/6. Se observó (Figura 9A) que a medida que se incrementa el número de pases en cultivo, disminuye la expresión de SOX9 de forma gradual. Este descenso correlaciona con un incremento en la expresión de Ink4A y descenso del marcador de mitosis fosfo-histona H3 (P-H3) (Figura 9B).

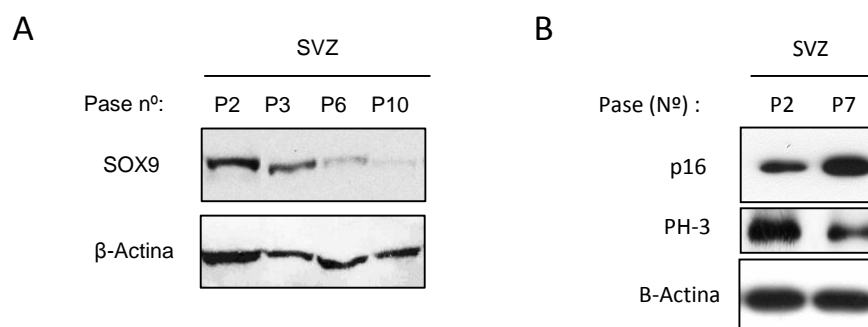


Figura 9. El cultivo seriado de neuroesferas induce un envejecimiento *in vitro* asociado a una disminución en los niveles de SOX9. (A) Los niveles de SOX9 disminuyen en las NSC procedentes de ratones SOX2-GFP con los pases en cultivo, y esto se asocia a **(B)** una mayor expresión del biomarcador de envejecimiento p16 así como a un descenso de PH-3. Los niveles de la β -Actina se emplearon como control de carga

2. Asociación de la expresión de SOX9 en las células madre neurales al alargamiento de supervivencia del organismo

Una copia extra de Ink4/Arf y p53 atenúa la pérdida de función de las NSC asociada al envejecimiento y se refleja en el comportamiento del animal

Se extrajo el tejido de la SVZ de ratones de las cepas C57Bl/6 y s-Ink4/Arf/p53 jóvenes (1 mes de edad), adultos (12 meses) y envejecidos (de 24 a 27 meses) y al igual que en los apartados anteriores, se procedió al cultivo y conteo en medio selectivo para células madre de neuroesferas. Se realizaron los ensayos de esferas primarias y secundarias con el fin de comparar el crecimiento y la auto-renovación entre ambos genotipos en los diferentes estadios de envejecimiento (Figura 10). En los animales jóvenes, se observa un menor número de NSC en los transgénicos respecto a los *wt*, mientras que en los adultos no se muestran diferencias entre ambos genotipos. Se observaron diferencias en los animales envejecidos, obteniéndose que en ambos genotipos la capacidad de formación de esferas disminuye con el envejecimiento, y que los animales transgénicos envejecidos presentan notablemente un incremento respecto a los *wt*. Se obtuvieron 17 esferas primarias en los animales s-Ink4/Arf/p53 envejecidos respecto a 11 en los *wt*, y 68 secundarias respecto a 48.

Relativizando ambos estudios se obtiene que ambas diferencias son estadísticamente significativas.

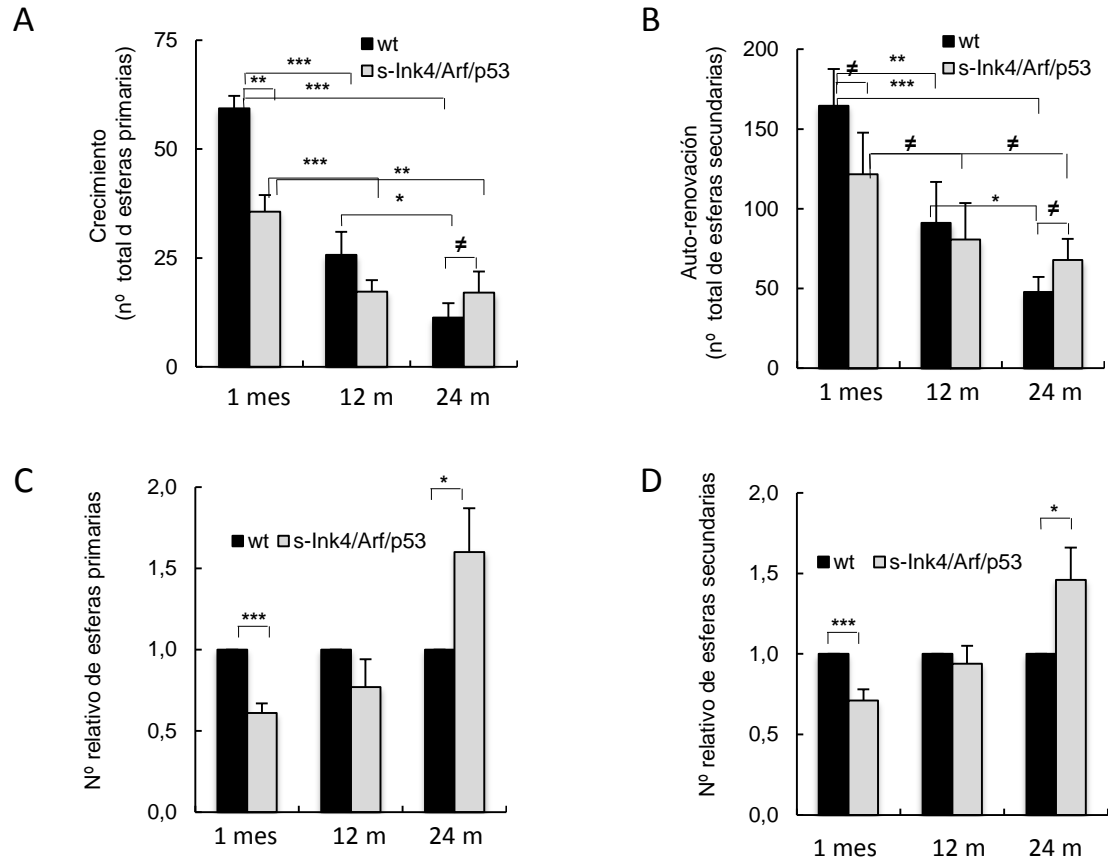


Figura 10. Una copia extra de Ink4/arf y p53 restaura la pérdida de la capacidad proliferativa y de auto-renovación asociada a la edad. Medida de la capacidad de formación de neuroesferas primarias y secundarias de la SVZ de ratones jóvenes, adultos y envejecidos transgénicos y wt. **(A, B)** Número total de esferas primarias y secundarias. **(C, D)** Número relativo. Cada barra representa el promedio de número de esferas relativo al wt y el EEM de experimentos independientes (n=4). Test *t* de Student. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Se analizó la población de células madre en la SVZ *in vivo* estudiando la expresión de Sox2 y Sox9 a nivel de ARNm en ratones jóvenes de ambos genotipos (Figura 11A), y mediante inmunohistoquímica en ratones adultos (Figura 11B). En ambos ensayos no se observaron diferencias significativas en expresión de estos marcadores, mientras que por medio del análisis de expresión de Sox2 y Sox9 junto con el de otros marcadores asociados a célula madre como Glast, Ars2, Ascl1, Spot14, Fasn o Hmga2, en la SVZ de ratones envejecidos (de 24 a 27 meses de edad), se determinó que sí existen diferencias significativas entre los genotipos (Figura 10C). Los ratones transgénicos envejecidos expresan una media de entre 1.5 y 2 veces más estos marcadores en la SVZ que los wt, consistente con el incremento de expresión de una

dosis génica de los supresores tumorales Ink4a, Arf y p21 (Figura 11C). Resultados similares se han obtenido en el giro dentado (datos no mostrados).

Además, para demostrar la actividad de las NSC de la SVZ de animales envejecidos, se determinó la expresión de los genes progenitores de DCX, PSA-NCAM (neuroblastos) y NeuN (neuronas) en el bulbo olfatorio, obteniéndose que los animales transgénicos envejecidos expresan mayores niveles de estos respecto a los wt (Figura 11D).

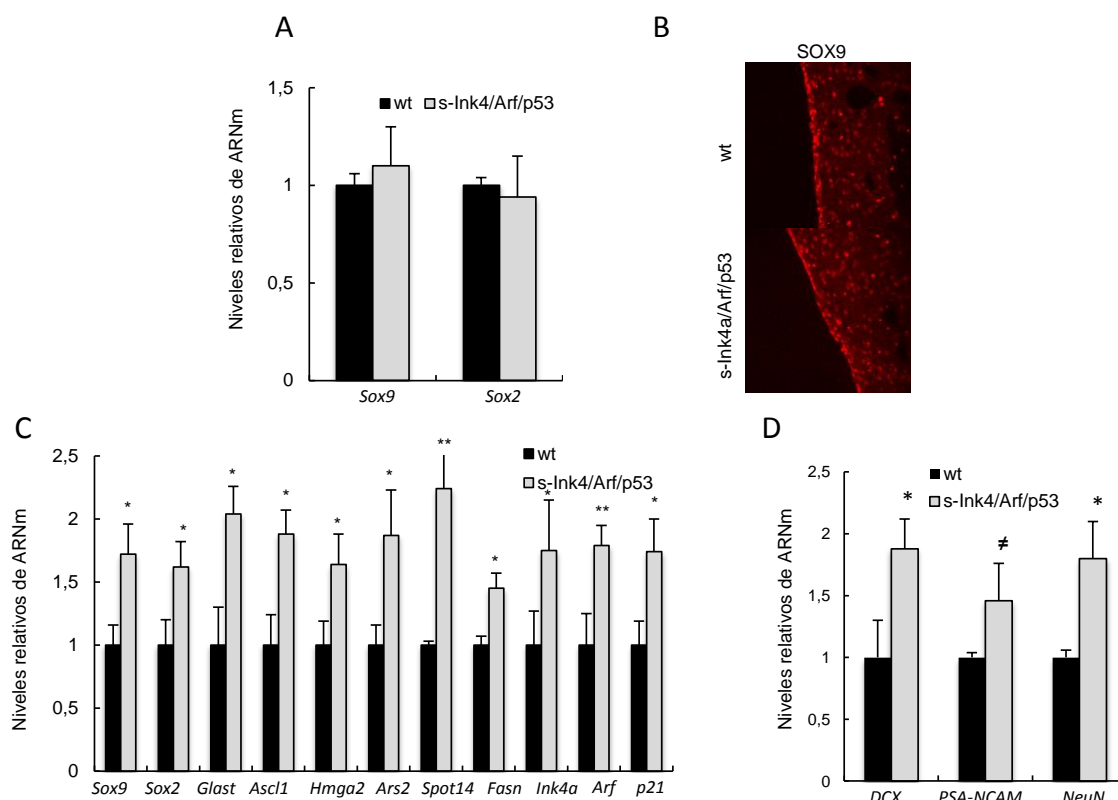


Figura 11. Una copia extra de Ink4/arf y p53 aminora la pérdida de expresión de marcadores de célula madre asociada a la edad. (A) Niveles de expresión de Sox2 y Sox9 a nivel de ARN en el tejido SVZ de ratones jóvenes (2 meses de edad). (B) Imagen representativa de la expresión de SOX9 en la SVZ de ratones adultos (9-12 meses) wt y transgénicos (n=3). (C) Los niveles del ARNm de diferentes marcadores de NSC fueron analizados de la SVZ de ratones envejecidos (24-30 meses) mediante qRT-PCR y normalizados respecto a los niveles del mensajero del gen que codifica la β -Actina, y fueron referidos a los niveles obtenidos en los wt. (D) Cuantificación de la expresión de marcadores de neuroblastos y neuronas en los bulbos olfatorios de ratones envejecidos. Las barras representan la media de los resultados y el EEM (n=5 de cada genotipo). Test *t* de Student. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Animales de ambos genotipos, tanto jóvenes como envejecidos, fueron sometidos a estudios para caracterizar la actividad cerebral. El *Tightrope* test o el test de cuerda, permite determinar la coordinación neuromuscular mediante el estudio de la capacidad que tienen los

Resultados

animales para mantenerse una cuerda. El otro test empleado es el del laberinto elevado en cruz o *Elevated Plus Maze* (EMP), estudio de comportamiento que incluye un aparato compuesto por dos brazos abiertos, dos brazos cerrados y un área central, que se encuentra elevado por encima del suelo. El animal es colocado en el centro del aparato y se le permite la exploración por un periodo de tiempo determinado (Becerra-García et al., 2007). De esta forma, se toma como índice de medida de ansiedad a la menor entrada en los brazos abiertos, de manera que mayor ansiedad cuando hay menor exploración en estos brazos y los animales permanecen en los brazos cerrados (más protegidos) en lugar de explorar los brazos con. En la figura 7 se muestra cómo en los animales jóvenes no existen diferencias entre los ratones *wt* y los transgénicos para ambos estudios, mientras que en los envejecidos, los portadores de una copia extra de *Ink4/Arf* y *p53* realizaron mejor el test de coordinación neuromuscular respecto a los *wt* (75% respecto al 20%) (Figura 12A). En la prueba EMP los ratones transgénicos fueron capaces de explorar más y permanecer más tiempo en las zonas abiertas del laberinto (12B, C), observándose menor número y tiempo de entradas en las zonas cerradas (12C) que los *wt*. Estos datos confirman que el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento está retrasado en este modelo con una copia extra de *Ink4a/Arf/p53* en parte al menos, por el mantenimiento de la actividad de las células madre neurales. Este modelo también refuerza el papel de *SOX9* y *SOX2* como biomarcadores de NSC y postula que su mantenimiento o re-activación podría ser una estrategia útil para evita el descenso en la actividad de las NSC asociado al envejecimiento.

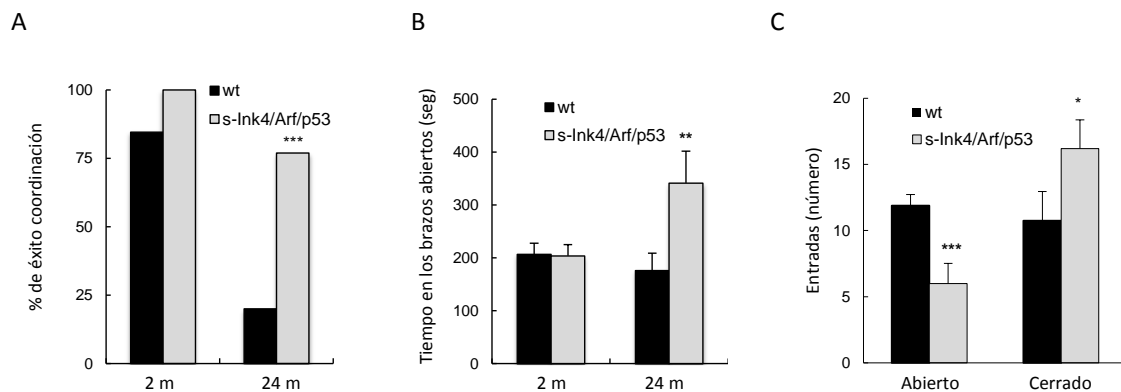


Figura 12. Ratones con una copia extra de *Ink4/arf* y *p53* presentan una mejor actividad cerebral funcional. (A) La coordinación neuromuscular fue cuantificada como el porcentaje de animales que pasó satisfactoriamente la prueba. Para esta se utilizaron ratones *wt* (13 jóvenes, 10 envejecidos) y *s-Ink4/Arf/p53* (6 jóvenes, 13 envejecidos). El análisis estadístico se realizó mediante el test de Fisher. (B) Representación del tiempo total que los animales de ambos genotipos que permanecieron en los brazos abiertos del laberinto en la prueba EMP y (C) número de veces que los animales entraron en los brazos abiertos y cerrados. Para la prueba se utilizaron animales *wt* (10 jóvenes, 8 envejecidos) y *s-Ink4/Arf/p53* (4 jóvenes, 5 envejecidos). Los ratones jóvenes eran de entre 6-10 meses de edad y los envejecidos de >24 meses. Los datos se presentan como \pm SEM. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

3. Rejuvenecimiento de las células madre envejecidas mediada por Sox9

Reactivación ectópica de SOX9 en las células madre neurales envejecidas C57Bl/6

Tras observar que los niveles de expresión de SOX9 disminuyen con el envejecimiento en las NSC tanto *in vivo* como *in vitro*, y que su expresión está aumentada en un modelo con deterioro cognitivo y envejecimiento retrasado, se procedió a la reactivación ectópica de SOX9 en las neuroesferas de ratones envejecidos C57Bl/6. Las células se infectaron mediante lentivirus portadores del plásmido de sobre-expresión de SOX9 (pWPXL SOX9), usando como control de infección el plásmido portador de EGFP (pWPXL GFP). De esta forma, mediante la verificación de que más del 90% de las esferas control estaban verdes por la expresión del gen EGFP, se pudo comprobar la eficiencia de infección al cabo de 48 horas (datos no mostrados). Una vez infectadas, se procedió a la realización de los ensayos descritos en el apartado 1.

Los niveles de SOX9 se estudiaron mediante western blot (Figura 13A) y RT-qPCR (Figura 13B). Mediante ambas técnicas se determinaron niveles superiores de SOX9 respecto al control, llegando incluso a ser 3 veces la expresión observada en las NSC jóvenes a nivel transcripcional.

Para el ensayo de proliferación y de auto-renovación, se contó el número total de esferas primarias y secundarias (Figura 13D, E). Se observó que las NSC infectadas con el plásmido de sobre-expresión de SOX9 eran capaces de formar un 60% más de neuroesferas tras la infección, implicando una mayor capacidad proliferativa.

Además, el número de esferas secundarias también fue superior obteniéndose una media de 93 esferas respecto a 54 que formó el control EGFP, indicando un mayor potencial de auto-renovación. En ambos casos las diferencias fueron estadísticamente significativas.

Tras la formación de neuroesferas secundarias caracterizó la expresión SOX2 como marcador de célula tanto a nivel de proteína como de ARNm, y se pudo comprobar que en las células con sobre-expresión de Sox9, Sox2 también se incrementa, demostrando que la reactivación de SOX9 no sólo incrementa la capacidad proliferativa y de auto-renovación, sino que eleva la expresión de marcadores de células madre neurales, datos que en su conjunto confirman que SOX9 modula el envejecimiento de las NSC y sugieren que su reactivación las rejuvenece. Además, estos datos sugieren una posible regulación entre ambos factores de transcripción, ya que también hemos determinado que SOX2 regula la expresión de SOX9 (ver datos más adelante) (Figura 13A, C).

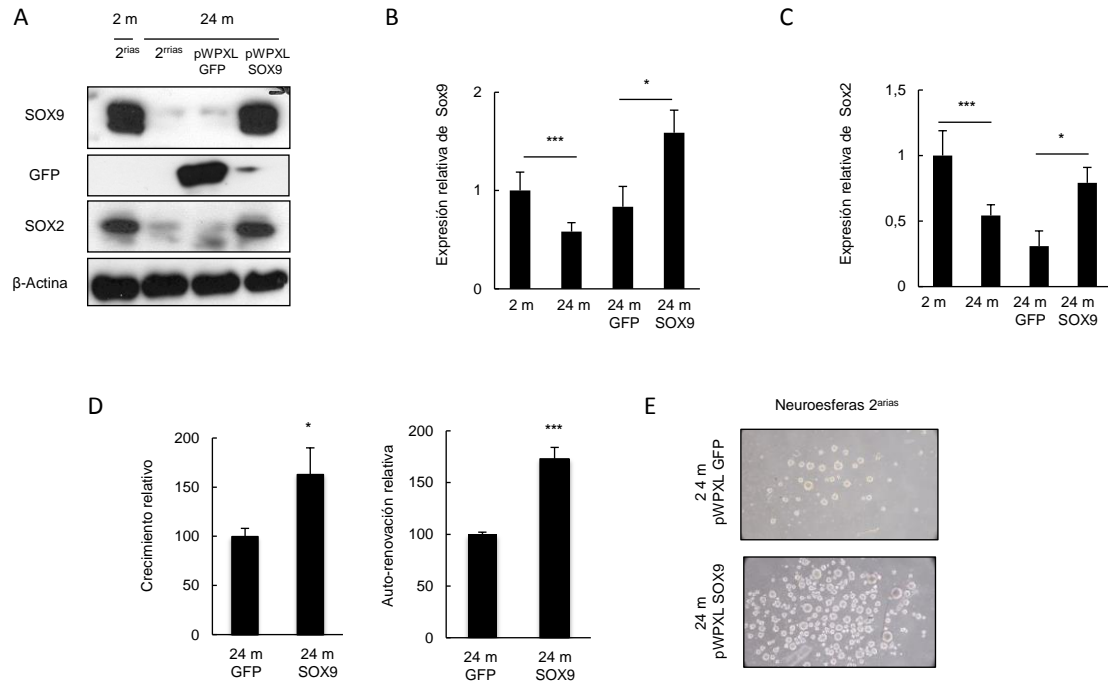


Figura 13. La expresión ectópica de SOX9 promueve un incremento en la proliferación y auto-renovación de las NSC envejecidas. (A) Comparativa de los niveles de expresión de SOX9, GFP y SOX2 a nivel de proteína mediante western blot. Los niveles de la β-Actina se emplearon como control de carga. (B, C) Análisis de expresión de Sox9 y Sox2 por ARN. Estos niveles fueron normalizados con los niveles del mensajero del gen que codifica para la β-Actina y fueron referidos a los niveles de las NSC jóvenes. (D) Medida de la capacidad de formación de neuroesferas primarias y secundarias tras infección lentiviral de Sox9 en NSC envejecidas. La sobre-expresión de SOX9 promueve la formación de mayor número tanto de esferas primarias como de secundarias. Cada barra representa el promedio de número de esferas relativo al control y el EEM de experimentos independientes (n=3). (E) Imágenes de contraste de fases que representan el aspecto físico de las neuroesferas envejecidas infectadas con GFP y con SOX9. Las barras representan la media de los resultados y el EEM (n=3). Test t de Student. *** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05.

Caracterización del envejecimiento de las NSC SOX2-GFP con los pases en cultivo

Se validaron estos resultados en el modelo de ratón SOX2-GFP, donde los niveles de expresión de SOX9 en neuroesferas de la SVZ también disminuyen con el incremento de los pases en cultivo (Figura 14A). Se determinó que dicha disminución de SOX9 está asociada con la capacidad de formación de neuroesferas a pase temprano (pase 2, P2) y pase tardío o largo (pase 7, P7), obteniéndose que las NSC de pase tardío forman una media de 67 esferas, un 40% menos que las de pase temprano (con una media de 107) (Figura 14B).

Teniendo estos datos en cuenta, se procedió a la sobre-expresión de SOX9 en las NSC de pase tardío procedentes de la SVZ de animales SOX2-GFP. Tras la realización del ensayo de formación de neuroesferas se pudo comprobar que la reactivación de SOX9 induce un

incremento en la formación de esferas, más exactamente, el número medio de neuroesferas de la condición control fue de 28 mientras que las infectadas con SOX9 presentaron una media de 84 esferas (Figura 14C). Para el estudio de la capacidad de auto-renovación, se determinó que el número de nuevas neuroesferas secundarias formadas por las NSC con sobre-expresión con SOX9 también era superior: 123 esferas de media en relación al control, que presentó una media de 54 (Figura 14D, E). En ambos casos las diferencias fueron estadísticamente significativas.

Los resultados en ambos modelos de envejecimiento (por edad y por pases seriados en cultivo) demuestran que la expresión de SOX9 regula, al menos en parte, el agotamiento las NSC observado a lo largo de este proceso.

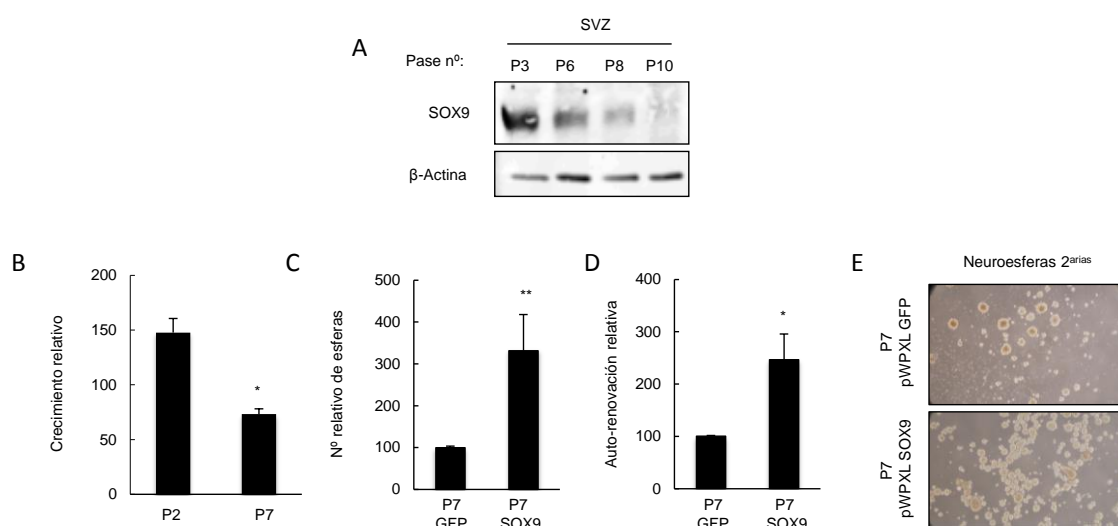


Figura 14. Caracterización del modelo de envejecimiento por pases de neuroesferas SOX2-GFP. (A)

Los niveles de SOX9 disminuyen en las NSC procedentes de ratones SOX2-GFP con los pases en cultivo. **(B)** Formación de NSC de la SVZ de ratones jóvenes SOX2-GFP a pase temprano (P2) y tardío (P7). La capacidad de formación de esferas disminuye con los pases. **(C, D)** Estudio de la capacidad de formación de neuroesferas **(C)** primarias y **(D)** secundarias de la SVZ de ratones de la cepa SOX2-GFP jóvenes y envejecidos infectados con SOX9. Cada barra representa el promedio de número de esferas relativo al control y el EEM de experimentos independientes (n=4) **(E)** Imágenes de contraste de fases que respresentan el aspecto físico de las neuroesferas procedentes de ratones SOX2-GFP envejecidas por pases infectadas con GFP y con SOX9 Test t de Student. *** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05.

4. Mecanismos implicados en el rejuvenecimiento de las células madre neurales: autofagia mediada por chaperonas y p38

A continuación, se procedió al estudio del posible mecanismo por el que SOX9 ejercía su acción. Para ello se tuvieron en cuenta tres procesos: estrés oxidativo, autofagia y vía de señalización de p38-MAPK. El primero porque ha sido descrito como uno de los implicados en el envejecimiento del organismo y celular en el que los sistemas antioxidantes se ven disminuidos (Sohal & Weindruch 1996; Finkel & Holbrook 2000). La autofagia, como se ha comentado en el apartado de introducción, está inversamente asociada con el envejecimiento, donde se ha observado que la expresión de proteínas asociadas a esta disminuye, y que la ausencia de esta desencadena un envejecimiento prematuro (Hara et al. 2006; Komatsu et al. 2005). Además, se ha asociado la inactivación de este proceso en el cerebro con un incremento en neurodegeneración (Komatsu et al. 2006; Hara et al. 2006). Y por último, la vía de p38-MAPK está directamente relacionada con el estrés oxidativo y con el envejecimiento de las células madre en otros tejidos (como páncreas, pulmón y músculo) (Li et al. 2011; Bernet et al. 2014; Ventura et al. 2007)..

La vía de señalización de p38, asociada a envejecimiento, está implicada en el mecanismo de rejuvenecimiento ejercido por SOX9 en las NSC

La activación de p38 es uno de los mecanismos mejor establecidos que ocurren en el envejecimiento de las células madre (Ventura et al. 2007; Wong et al. 2009; Brien et al. 2013). La vía de p38 ha sido asociada por diversos estudios con el proceso de envejecimiento. Esta vía al ser propiamente una vía activada por estrés (Han J, 2007; Cuenda, 2005), se activa a lo largo de este proceso mediante un incremento de la fosforilación de p38 (Li, 2011; Wu, 2015; Hsieh, 2002). Teniendo en cuenta que nuestros resultados relacionan de manera inversa a SOX9 con el envejecimiento de las NSC, se estudió la posible implicación de la vía de p38 en el mecanismo rejuvenecedor de SOX9. Para ello, se estudió el estado de activación (fosforilación) p38 (p-p38) en las muestras de NSC jóvenes, envejecidas, infectadas con GFP e infectadas con SOX9. Los experimentos revelaron que los niveles de p-p38 son muy superiores en las NSC de animales envejecidos respecto a las NSC de animales jóvenes, y también que en las NSC con reactivación de SOX9 los niveles de activación de p38 descienden de manera muy notable, siendo los niveles de fosforilación semejantes a los hallados en las NSC derivadas de animales jóvenes (Figura 15). Estos datos sugieren que la activación de la vía de p38 puede estar mediando el envejecimiento de las NSC.

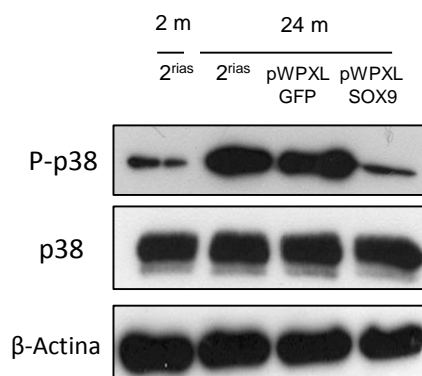


Figura 15. Estudio de la expresión de p-p38 en células envejecidas con reactivación ectópica de SOX9. Determinación de los niveles de expresión de p-p38 y p38 en NSCs jóvenes y envejecidas infectadas con GFP y con SOX9 a nivel de proteína mediante western blot. Los niveles de la β -Actina se emplearon como control de carga.

Para validar esta hipótesis, se inhibió p38 en las NSC envejecidas siguiendo dos estrategias diferentes: inhibición farmacológica mediante el uso de un inhibidor específico (PH797804) e inhibición genética (ratones deficientes en p38).

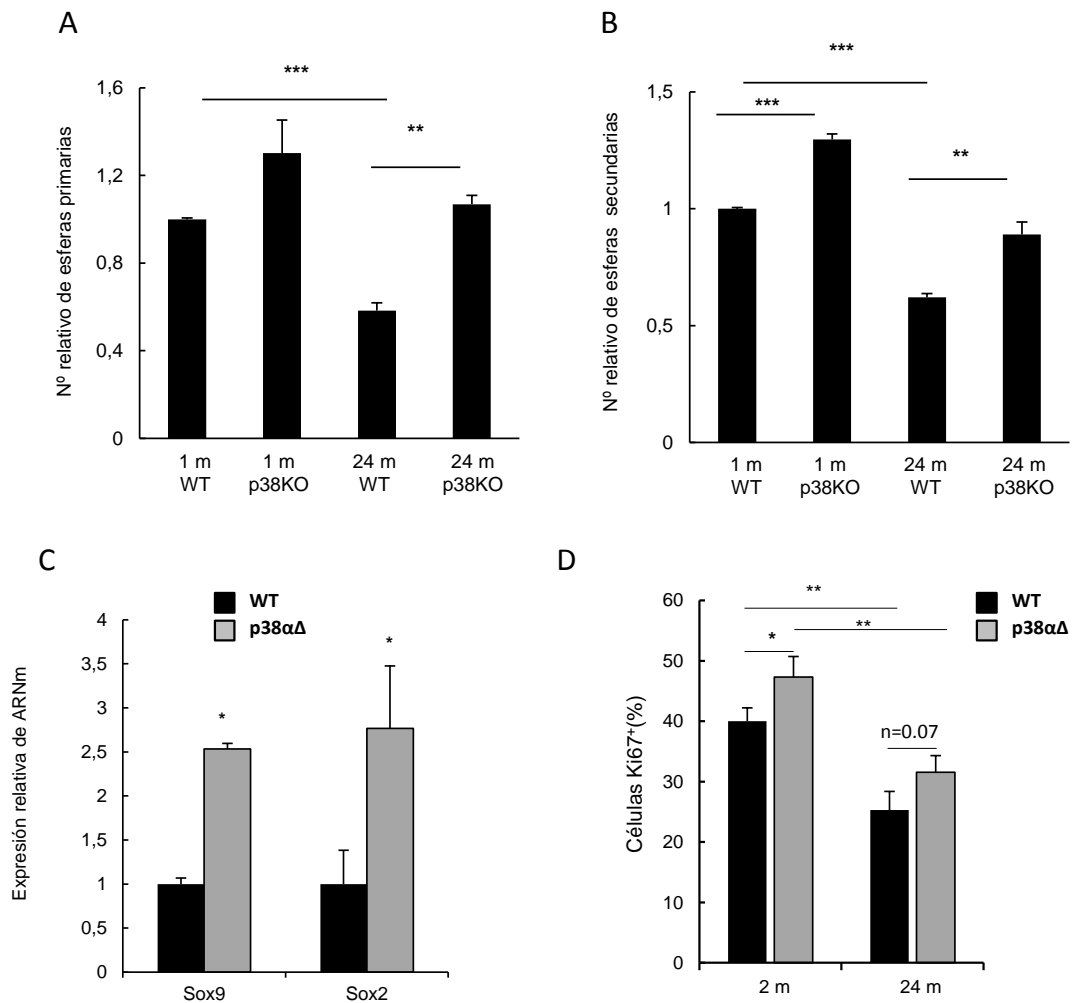
Para el primer modelo de validación se utilizaron ratones *wt* y *p38^{ΔΔ}*, tanto jóvenes (2 meses) como envejecidos (24 meses) de los que se extrajo la SVZ para realizar ensayos de neuroesferas tal y como se han descrito en apartados anteriores. Como se puede observar en la figura 16, tanto en ratones jóvenes como en envejecidos, los ratones deficientes en p38 son capaces de formar un mayor número de esferas primarias, siendo un 30% mayor en los jóvenes y cerca de un 50% en los envejecidos. En las neuroesferas secundarias también se observó una mayor capacidad para los transgénicos respecto a los *wt*. Además, parte del tejido de la SVZ de estos ratones fue utilizado para la extracción de ARNm y el análisis de la expresión de Sox9 y Sox2, donde se pudo comprobar que la expresión de ambos en la SVZ de los ratones transgénicos envejecidos era superior a la de los *wt*, siendo 2.5 y 2.7 veces superior para Sox9 y Sox2 respectivamente. En ambos casos estas diferencias fueron estadísticamente significativas (Figura 16C).

Además de presentar mayores niveles de Sox9 y Sox2, la SVZ de estos ratones transgénicos presentaba mayores niveles del marcador de proliferación Ki67 (Figura 16D). Se determinó una media de 40 células positivas para los ratones jóvenes *wt* mientras que para los transgénicos de esta edad se observó una media de 47, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. En los ratones envejecidos también se observaron diferencias: 25 células Ki67⁺ para los *wt* y 32 para los transgénicos. Estos resultados van en concordancia con la mayor

Resultados

capacidad de formación de neuroesferas así como la mayor expresión de marcadores asociados a célula madre.

En el segundo modelo de validación de la implicación de p-p38 en el envejecimiento de las NSC, se estudió la capacidad de formación de neuroesferas de 4 ratones envejecidos bajo el efecto del inhibidor de p38 PH797804. Para ello se añadió el compuesto a los cultivos de neuroesferas a una concentración de $1\mu\text{M}$ y al cabo de 7 días se procedió al conteo del número de neuroesferas. Como se aprecia en la figura 23E, por cada esfera formada en la condición control, se formaron 1.88 bajo el efecto del inhibidor. Tras el conteo, se extrajo el ARNm de estas NSC y se estudió la expresión de los marcadores Sox9 y Sox2, determinándose que las muestras tratadas con el inhibidor presentan mayor expresión tanto de Sox2 (2.2 veces más) como de Sox9 (1.45 veces más) respecto las células no tratadas (Figura 16F).



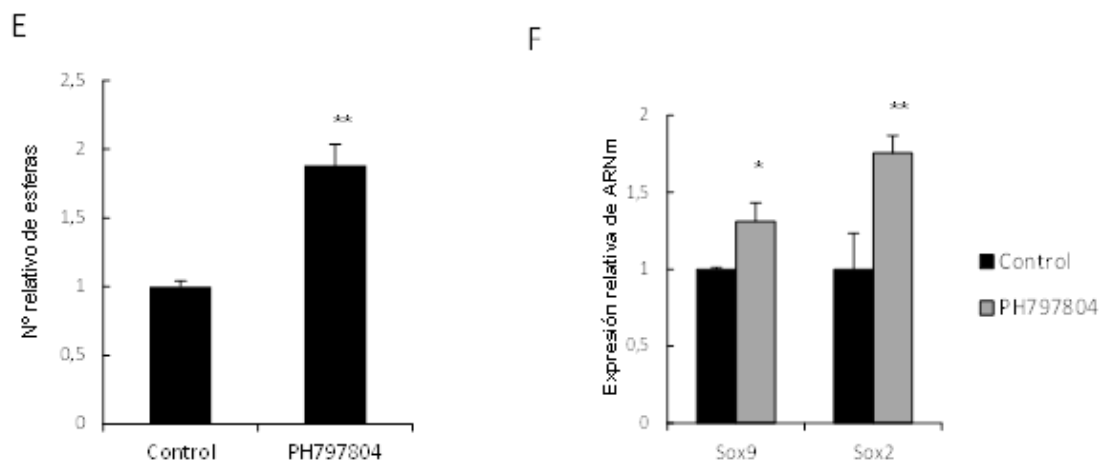


Figura 16. La ausencia o inhibición de la vía p38-MAPK tiene un efecto negativo sobre la capacidad de formación de neuroesferas. (A,B) Capacidad de formación de neuroesferas primarias y secundarias de la SVZ de ratones jóvenes (1-2 meses) y envejecidos (23-24 meses) wt y p38KO. Cada barra representa el promedio de número de esferas relativo a las wt jóvenes y el EEM de experimentos independientes (n=4 animales por condición). (C) Medida de la expresión de Sox2 y Sox9 a partir del tejido SVZ de los ratones envejecidos mediante qRT-PCR. Las barras representan la media de los resultados y el EEM (n=4). (D) Contaje del número de células positivas para Ki67 en la SVZ de ratones jóvenes y envejecidos wt y p38 KO. (E) Ensayo de formación de neuroesferas de la SVZ de ratones wt envejecidos (24 meses) bajo el efecto del inhibidor de p38 PH797804 (1 μ M) al cabo de 7 días de tratamiento. Cada barra representa el promedio de número de esferas relativo a las NSC tratadas con el vehículo (control) y el EEM de experimentos independientes (n=4). (F) Medida de la expresión de Sox2 y Sox9 mediante qRT-PCR de las neuroesferas tratadas con el inhibidor respecto a las control. Test *t* de Student. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Estos resultados demuestran que la vía p38-MAPK está implicada en el mecanismo de rejuvenecimiento mediado por SOX9, y que su inactivación promueve el fenotipo más parecido al de NSC procedentes de animales jóvenes.

SOX9 restaura la disminución de la actividad de autofagia asociada al envejecimiento

Algunas evidencias asocian al proceso de autofagia con la actividad de las células madre y a su vez, con el envejecimiento (Phadwal et al. 2013; Vessoni et al. 2012; Guan et al. 2013). Se estudiaron los niveles Lamp2A como marcador de CMA y LC3B para MA a nivel de proteína en neuroesferas con reactivación de SOX9 (Figura 17). Los resultados indicaron que la expresión de ambas proteínas disminuye a más de la mitad con el envejecimiento de estas NSC, pero cuando estas son infectadas con SOX9, su expresión se recupera totalmente a este nivel. Estos datos postulan que la CMA y la MA pueden jugar un papel importante en la regulación de las

Resultados

NSC, acción parcialmente descrita en caso de MA, pero desconocida en el caso de CMA. También sugieren que SOX9 puede estar regulando el proceso de autofagia.

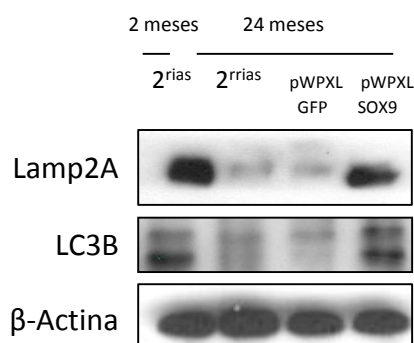


Figura 17. Caracterización de la autofagia en NSC y su relación con SOX9. Comparativa de los niveles de expresión de Lamp2A y LC3 en NSCs jóvenes (n=3), envejecidas infectadas con GFP y con SOX9 (n=6) a nivel de proteína mediante western blot. Los niveles de la β-Actina se emplearon como control de carga.

Basándonos en la novedad de la posibilidad de que SOX9 pueda regular de algún modo este proceso, se utilizó el modelo de MEFs procedentes de animales *wt*, *Z/SOX9tg* y de cepas deficientes en SOX9 a través de un sistema Cre/LoxP inducible por tamoxifeno (1 μ M) *in vitro* (SOX9^{Flox/Flox}).

Para el análisis de CMA, los MEFs *wt* y *Z/SOX9tg* fueron infectados con lentivirus portadores del plásmido reportero KFERQ-mCherry1. Se realizó un primer ensayo comparando la actividad CMA en ambas líneas cultivadas en su medio estándar, y en ausencia de suero. Se observó que los MEFs con sobre-expresión de SOX9 presentan una actividad significativamente superior de CMA (medida por mayor número de lisosomas fluorescentes alrededor del núcleo) en condiciones normales y aun mayor en ausencia de suero, llegando a duplicar la actividad CMA observada en los *wt* en ambos casos (Figura 18A). Teniendo en cuenta que el proceso de autofagia se induce bajo condiciones de estrés (Ogata et al. 2006; Chen et al. 2008), se repitió el mismo experimento sometiendo a las células a diferentes tipos de estreses: con paraquat (PQ) como inductor de estrés oxidativo; tapsigargina (TG) como inductor de estrés en el retículo endoplásmico; etopósido (Etop) para inducir estrés genotóxico; y finalmente ácido oleico (Oleic) como inductor de estrés lipotóxico. Como resultado se obtuvo que en presencia de los diferentes tipos de estrés los MEFs *wt* aumentan su actividad CMA y los SOX9Tg continúan manteniendo elevados sus niveles, seguramente por estar ya en un punto de saturación, hasta el punto en el que las diferencias entre ambos genotipos sigue siendo

significativa (Figura 18B). Tras estudiar los niveles del gen *Lamp2a* en ambos tipos celulares, se observó que los MEFs SOX9Tg expresan un 67% más de esta proteína a nivel transcripcional siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Figura 18C). Estos datos postulan que SOX9 puede ser un novedoso regulador de CMA.

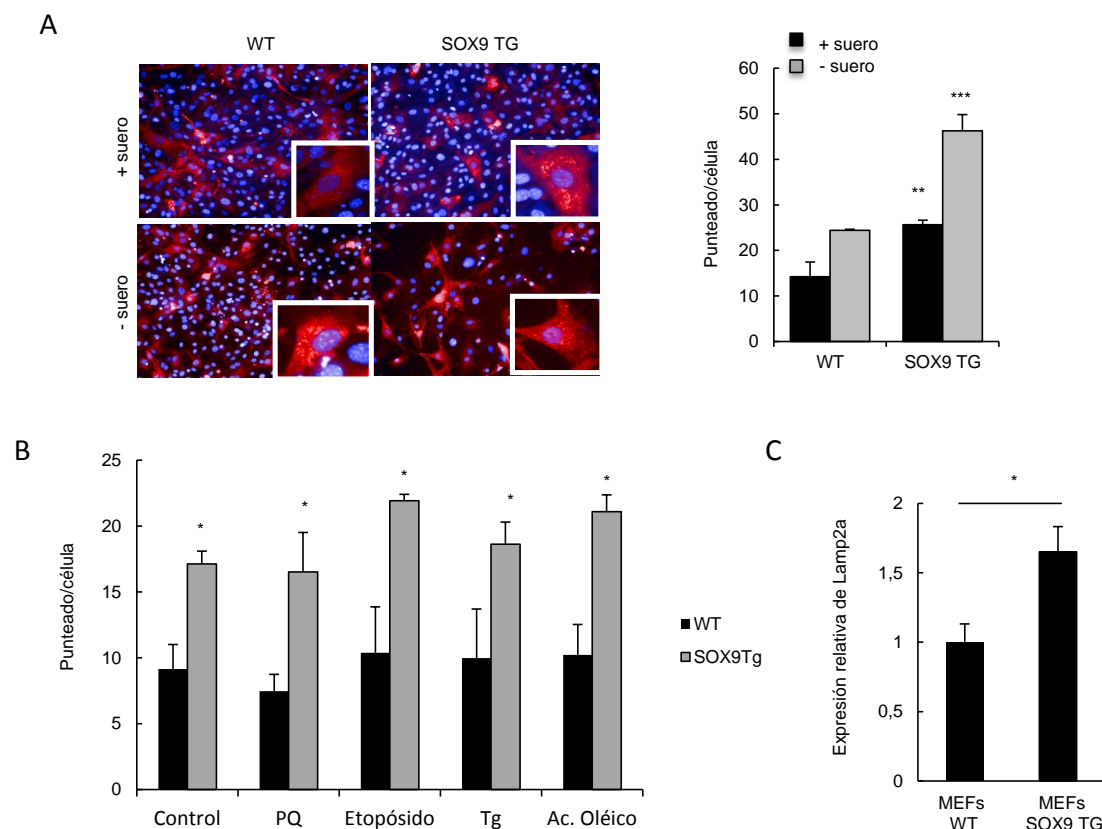


Figura 18. Caracterización de autofagia mediada por chaperonas (CMA) en MEFs wt y Z/SOX9Tg. (A) MEFs wt y transgénicos transfectados con el plásmido reportero fotoactivable KFERQ-Dendra. Tras la fotoactivación las células se mantuvieron en medio en presencia y ausencia de suero. *Izquierda*. Imágenes representativas. *Derecha*. Cuantificación del número de puntos (rojos) por célula en >50 células de al menos 4 campos diferentes. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. (B) MEFs wt y Z/SOX9Tg transfectados con el plásmido reportero KFERQ Dendra cultivados en presencia de diferentes tipos de estrés: paraquat 0,1 mM, etopósido 10 μ M, taspargina 500 μ M y ácido oléico 0,1 mM. (C) Expresión de *Lamp2a* a nivel de ARN mensajero MEDIANTE qRT-PCR en MEFs wt y SOX9Tg. Las barras representan la media de los resultados y el EEM (n=2). Test *t* de Student. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Los ensayos se realizaron también en MEFs obtenidos de ratones deficientes en SOX9 (SOX9^{Flox/Flox}). En este caso, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la actividad de CMA entre esta línea y la *wt* (datos no mostrados).

Resultados

Para el estudio de la actividad MA, se infectaron los MEFs *wt* y Z/SOX9tg con el plásmido mCherry-GFP-LC3. Se midió la actividad de MA, bajo condiciones normales y en ausencia de suero, por la relación de autogafolisomas/autofagosomas. Se pudo observar que esta actividad en los MEFs SOX9Tg es significativamente menor que en los fibroblastos *wt* obteniéndose tanto menor número de autofagosomas como de autofagolisomas formados. Incluso, así como la ausencia de suero incrementa esta actividad MA en los *wt*, no se observó el mismo resultado en los transgénicos ni en presencia ni en ausencia de suero (Figura 19A, B, C). Se analizó la expresión génica a nivel de ARNm del gen *Atg7* como marcador de MA, y aunque sí se observó una tendencia a presentar menores niveles en los MEFs SOX9Tg, esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa (datos no mostrados).

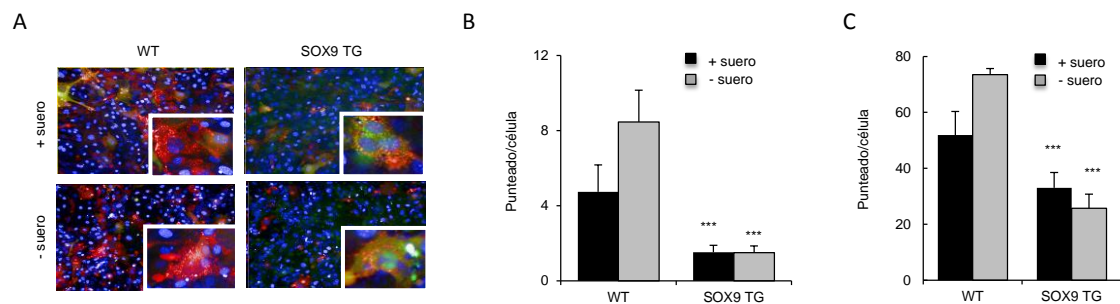


Figura 19. Caracterización de macroautofagia (MA) en MEFs *wt* y Z/SOX9Tg. (A) MEFs *wt* y Z/SOX9Tg transfectados con el plásmido reportero mCherry-GFP-LC3 cultivados en presencia y ausencia de suero. *Izquierda*. Imágenes representativas. *Derecha*. Cuantificación del número de (B) autofagosomas (mCherry GFP positivos por célula) y (C) autofagolisomas (mCherry positivo y GFP negativo) en >50 células en al menos 4 campos diferentes. Las barras representan la media de los resultados y el EEM (n=3). Test t de Student. *** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05

Los ensayos se realizaron también en MEFs SOX9^{Flox/Flox}. En este caso, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la actividad de MA entre esta línea y la *wt* (datos no mostrados).

SOX9 regula directamente CMA y esta regulación se mantiene bajo condiciones de estrés oxidativo

Tras haber observado que elevados niveles de SOX9 regulan de manera inversa los procesos de CMA y MA, aumentando e inhibiendo su actividad respectivamente, el siguiente paso consistió en determinar el mecanismo de acción. En primer lugar, nos hemos centrado en estudiar si la activación de CMA se produce de forma directa o indirecta. Para ello se realizó un ensayo de

medición de la actividad luciferasa en un plásmido asociado al promotor de Lamp2A en células 293T en presencia o ausencia de SOX9 co-transfectadas con el plásmido ligado a luciferasa y con el plásmido de sobre-expresión de SOX9. De esta forma, la cantidad de luz producida será directamente proporcional a la expresión del promotor de Lamp2a, y en presencia y ausencia de SOX9 podremos determinar si este factor ejerce algún tipo de regulación sobre el promotor de Lamp2a. Se muestra en la figura 20 que la actividad luciferasa aumenta hasta 400 veces en presencia de SOX9 respecto al control sin sobre-expresión. A continuación se repitió el experimento pero esta vez las células fueron cultivadas en presencia y ausencia de paraquat (0.5 mM) como inductor de estrés oxidativo a lo largo de 12 horas para determinar si existen diferencias bajo ambas condiciones. Se pudo comprobar que esta actividad aumenta hasta 700 veces bajo el efecto este estrés. En ambos casos la actividad de la luciferasa de Lamp2a se relativizó respecto a la actividad de la renilla, que se expresa bajo un promotor constitutivo de la célula y es utilizado para relativizar la actividad luciferasa de forma que el efecto observado se deba exclusivamente al inducido o no por SOX9. Los resultados indican que SOX9 induce de manera directa la expresión de Lamp2a y que este efecto se produce tanto en condiciones basales como en condiciones de estrés.

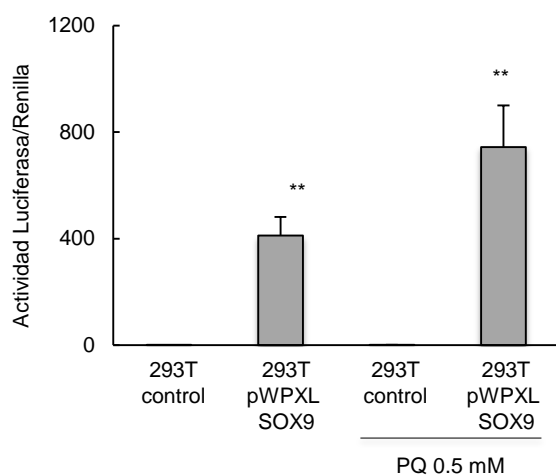


Figura 20. SOX9 regula directamente CMA y este efecto se mantiene bajo condiciones de estrés oxidativo. (A) Medida de actividad luciferasa ligada al promotor de Lamp2a con y sin sobre-expresión de SOX9 en MEFs cultivados en presencia y ausencia de y de paraquat (0.5 mM). La actividad luciferasa se relativizó respecto a la actividad de la renilla. Las barras representan la media de los resultados y el EEM (n=2). *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

SOX9 protege ante el efecto de estrés oxidativo

Para determinar el efecto que el estrés oxidativo tiene sobre SOX9, se obtuvieron MEFs de ratones *wt* (C57Bl/6). Estos MEFs fueron cultivados bajo las condiciones de 20% y 3% de

Resultados

oxígeno, y se determinaron las posibles diferencias existentes entre los pases en cultivo tempranos (pase 1, p1) y tardíos (pase 5, p5) en ambas condiciones de oxígeno.

Se observó que bajo el 3% de oxígeno las células mantienen elevada la expresión de marcadores antioxidantes Sesn1, GPX y MnSOD a nivel de ARNm en comparación con los cultivados al 20%. Los niveles de estos marcadores disminuyen con el número de pases en cada condición, pero los MEFs cultivados al 3% de oxígeno presentan niveles significativamente más elevados tanto en su pase temprano como en el tardío, que los cultivados al 20% (Figura 21A). Estos datos resultan estar asociados a una menor acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (datos no mostrados). Se determinaron los niveles de expresión de Sox9 en dichas células, y se pudo comprobar que existe una mayor expresión de SOX9 respecto a las condiciones de 20%. Se observó además, que los niveles de SOX9 son similares entre el pase temprano al 20% y el pase tardío al 3% de oxígeno (Figura 21B), asociando a SOX9 con una posible protección ante estrés oxidativo.

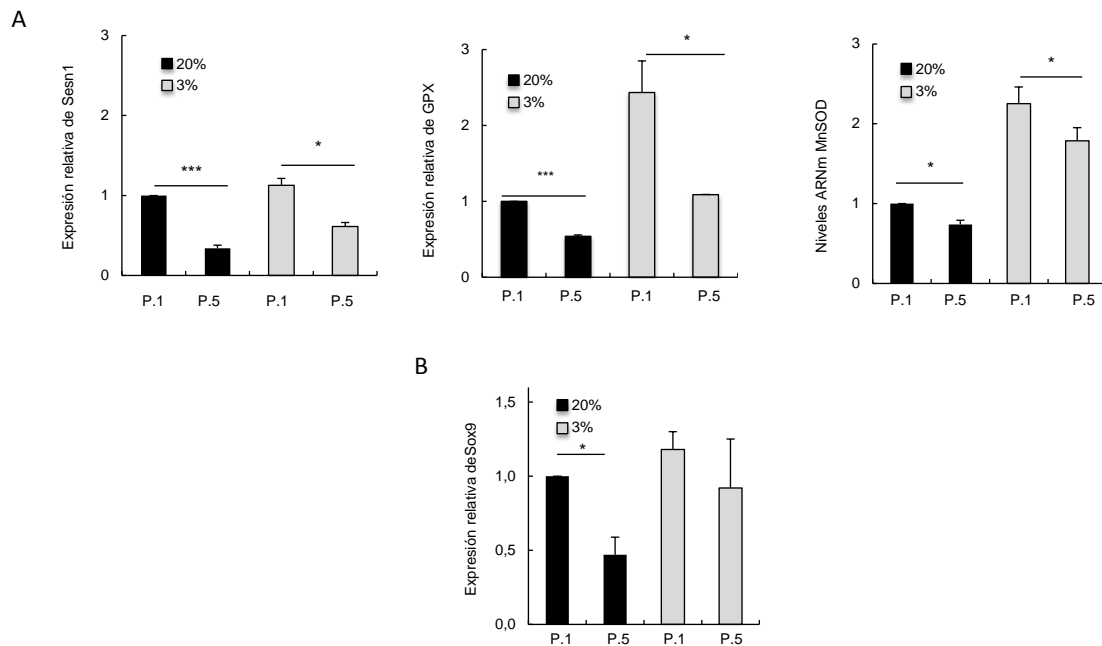


Figura 21. SOX9 protege ante el estrés oxidativo en MEFs. (A) Niveles del ARNm de marcadores antioxidantes Sesn1, GPX y MnSOD en los MEFs wt cultivados al 20 y 3% de oxígeno a pase 1 y pase 5. Los niveles del ARNm de los genes fueron normalizados respecto a los niveles del mensajero del gen que codifica la β -Actina, y fueron referidos a los niveles obtenidos en los MEFs cultivados al 20% de oxígeno. Las barras representan la media de los resultados y el EEM (n=3). **(B)** Niveles de expresión de Sox9 medido por qRT-PCR normalizado con los niveles del gen β -Actina y relativos a la condición cultivada al 20% y de pase 2. Test t de Student. *** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05.

Para confirmar esta posible relación entre SOX9 y la protección ante estrés oxidativo, se estudió la expresión de los mismos marcadores antioxidantes en MEFs extraídos de ratones portadores de una copia extra de SOX9 (Z/SOX9tg), y se pudo observar que MEFs con sobre-expresión de SOX9 presentan niveles elevados de marcadores antioxidantes, siendo en todos los casos esta diferencia estadísticamente significativa y llegando el caso de GPX a ser hasta 10 veces mayor que los *wt* (Figura 22A). Además, se observó que las proteínas de estos MEFs Z/SOX9tg presentan un 27% menos de oxidación que las de los MEFs *wt* como consecuencia de un menor daño oxidativo (Figura 22B). Estos datos son consistentes con la mayor capacidad proliferativa observada en los MEFs Tg y menos acumulación de los supresores tumorales p16/p19 y p53 (Matheu et al. 2012).

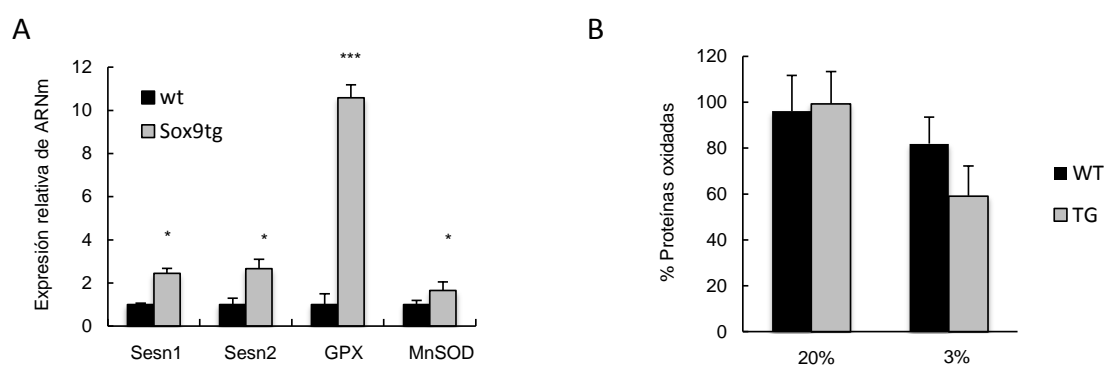


Figura 22. SOX9 protege ante el estrés oxidativo en MEFs. (A) Niveles del ARNm de marcadores antioxidantes Sesn1, Sesn2, GPX y MnSOD en los MEFs *wt* y transgénicos para SOX9. **(B)** Gráfica con los resultados de oxiblot donde se muestra el porcentaje de proteínas oxidadas entre MEFs *wt* y Z/SOX9Tg bajo las distintas condiciones de oxígeno (n=3). Los niveles de expresión de todos los genes fueron normalizados con los niveles del mensajero del gen que codifica la β -Actina, y fueron referidos a los niveles obtenidos en las NSC *wt*. Las barras representan la media de los resultados y el EEM (n=4). Test *t* de Student. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Tras los estudios en MEFs, se procedió al estudio de este tipo de estrés en neuroesferas de la SVZ de ratones *wt* envejecidos. Neuroesferas procedentes de ratones envejecidos fueron tratadas con el antioxidante Trolox (0,5 mM) a lo largo de 7 días, y al cabo de dicho plazo se contabilizó el número total de esferas formadas. Las células tratadas con Trolox formaron un 60% más de neuroesferas que las no tratadas, y este incremento está asociado a un aumento significativo en los niveles de Sox2 (Figura 23A, B). En este caso, los niveles de Sox9 permanecieron invariables (datos no mostrados).

Estos datos demuestran que la expresión de SOX9 está en relación directa con la expresión de los sistemas antioxidantes y que esta relación a su vez influye en el fenotipo observado.

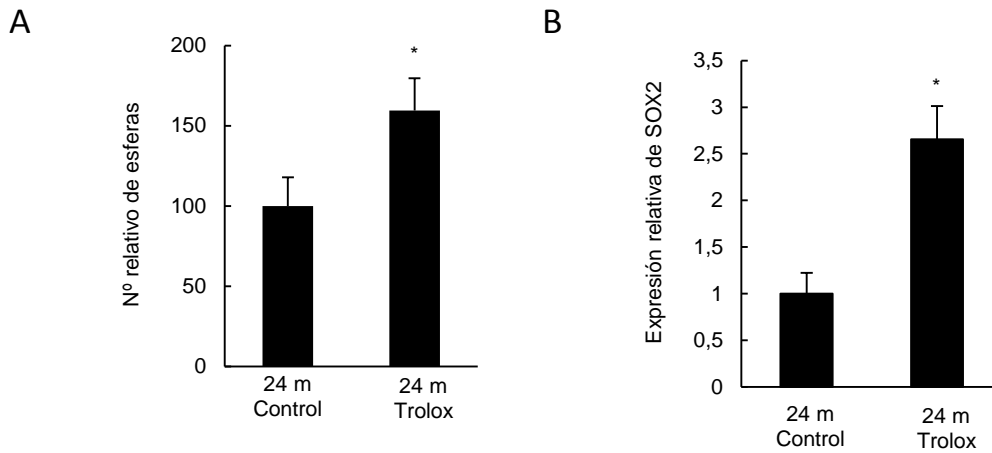


Figura 23. SOX9 protege ante el estrés oxidativo en MEFs. (A) Capacidad de formación de neuroesferas de la SVZ de ratones envejecidos tratadas con y sin Trolox (500 μM). **(B)** Medida de la expresión de Sox2 a nivel de ARNm en las NSC envejecidas tratadas con y sin Trolox. Los niveles de expresión de todos los genes fueron normalizados con los niveles del mensajero del gen que codifica la β-Actina, y fueron referidos a los niveles obtenidos en las NSC wt. Las barras representan la media de los resultados y el EEM (n=4). Test *t* de Student. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Para continuar con esta caracterización en las NSC, se extrajeron neuroesferas de la SVZ de ratones reporteros para CMA (KFERQ-Dendra) portadores de la proteína Dendra fluorescente, y una vez en cultivo se infectaron con lentivirus portadores de los plásmidos de sobre-expresión de SOX9 y su respectivo control GFP. Al cabo de 48 horas las NSC se adhirieron a cubreobjetos pre-tratados con laminina para que una vez en adhesión, se procediera a la cuantificación de la fluorescencia emitida en cada condición, siendo cada punto fluorescente un lisosoma donde la proteína Dendra se está degradando por CMA. Se demostró que las NSC infectadas con SOX9 presentan una mayor actividad de CMA respecto a las células control, obteniéndose una media de 13 respecto a 27 lisosomas fluorescentes por núcleo en las NSC control y con sobre-expresión de SOX9, respectivamente. Esta diferencia resultó ser estadísticamente significativa (Figura 24).

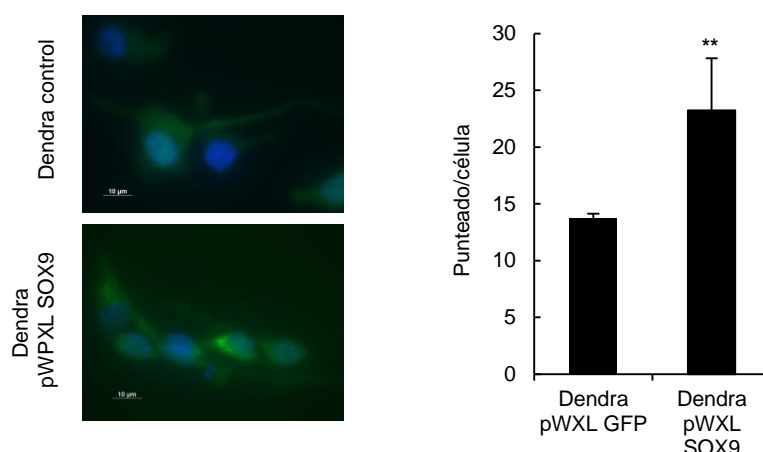


Figura 24. Sobre-expresión de SOX9 en neuroesferas procedentes de la SVZ de ratones reporteros de CMA. Neuroesferas extraídas de la SVZ de ratones reporteros de CMA (expresan la proteína fotoactivable KFERQ-mcherry1) fueron infectadas mediante lentivirus con SOX9. Sin necesidad de fotoactivación, las células se mantuvieron en medio selectivo. Izquierda. Imágenes representativas. Aumento 40x. Derecha. Cuantificación del número de puntos (verdes) por célula en >50 células de al menos 4 campos diferentes. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra calibradora: 10 µm. Las barras representan la media de los resultados y el EEM (n=3). Test t de Student. *** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05.

La ausencia de autofagia disminuye la capacidad de proliferación y auto-renovación de las NSC

Tras observar que el efecto en MEFs también puede observarse en NSC, se procedió a la caracterización de las NSC de la SVZ de ratones *lamp2A knock out* (L2AcKO). Para ello se extrajo tejido de la SVZ de ratones *wt* y L2AcKO adultos y se realizaron los ensayos de formación de neuroesferas primarias y secundarias (Figura 20). Se observó que las NSC procedentes de ratones L2AcKO formaban una media de 84 esferas primarias respecto a las 135 formadas en los animales *wt*, sugiriendo que el número y la actividad de las células madre depende de la CMA para su mantenimiento y/o supervivencia. El conteo de las secundarias determinó que el número de éstas también era menor en los ratones L2AcKO en comparación con los animales *wt*, obteniéndose una media de 150 y 100 esferas *wt* y L2AcKO respectivamente. Estos datos asocian a estas neuroesferas L2AcKO con una menor capacidad de auto-renovación (Figura 25A, B). Para validar este efecto, se realizó una inhibición de la autofagia durante 7 días en NSC de animales *wt* mediante cloroquina (CQ) a distintas concentraciones (10, 20 y 30 µM). Se contabilizó el número de esferas y los resultados mostraron que a medida que la concentración de CQ aumenta, disminuye el número de

Resultados

esferas que son capaces de formar, hasta el punto de que a 30 μM no se formó ni una esfera (Figura 25C). En todos los casos las diferencias fueron estadísticamente significativas, indicando que el proceso de autofagia está implicado en la regulación de las células madre neurales.

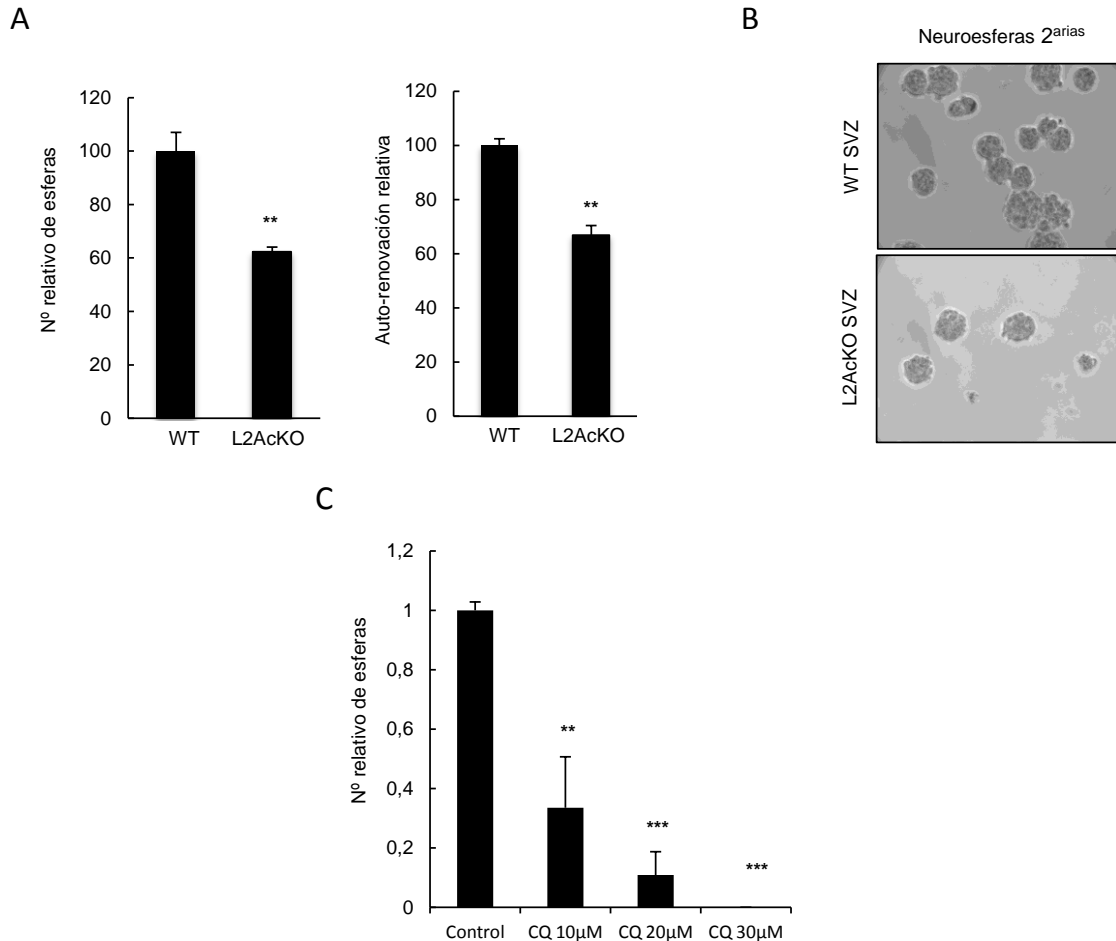


Figura 25. Neuroesferas de la SVZ de ratones L2AckO tienen menor capacidad de proliferación y auto-renovación. (A) Ensayo de la capacidad de formación de neuroesferas primarias y secundarias por cada 10^4 células de ratones wt y L2AckO. (B) Imágenes de contraste de fases que representativas del aspecto físico de las neuroesferas L2AckO y wt. Aumento 20x. (C) Ensayo de formación de neuroesferas de la SVZ de ratones wt bajo diferentes concentraciones de cloroquina (CQ). Cada barra representa el promedio del número de esferas relativo a las wt y el EEM de experimentos independientes (n=3). Test *t* de Student. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Para extender la caracterización que la CMA tiene en la población de NSC, se extrajo el tejido de la SVZ de tres ratones adultos wt y tres L2AckO y analizó *ex vivo* la expresión de Sox9 así como de distintos marcadores de célula madre: Sox2, Hmga2, y Glast, mediante qRT-PCR. Los resultados demuestran que el tejido SVZ de ratones L2AckO presenta hasta un 40% menos de

expresión de SOX9, y que el resto de marcadores también muestran un descenso significativo de la expresión de estos (Figura 26A). Además, también se pudo observar que la SVZ de estos ratones L2AcKO expresa el doble del marcador de envejecimiento, senescencia y NSC, p16 (Molofsky et al. 2006) que los *wt*, y que esta diferencia es estadísticamente significativa (Figura 26B). Estos resultados van en concordancia con el menor número de esferas primarias y secundarias observado en el apartado anterior, confirmando que el número de células madre *in vivo* e *in vitro* está disminuido en ausencia de actividad CMA y postulando este proceso como vital en el mantenimiento de estas células madre.

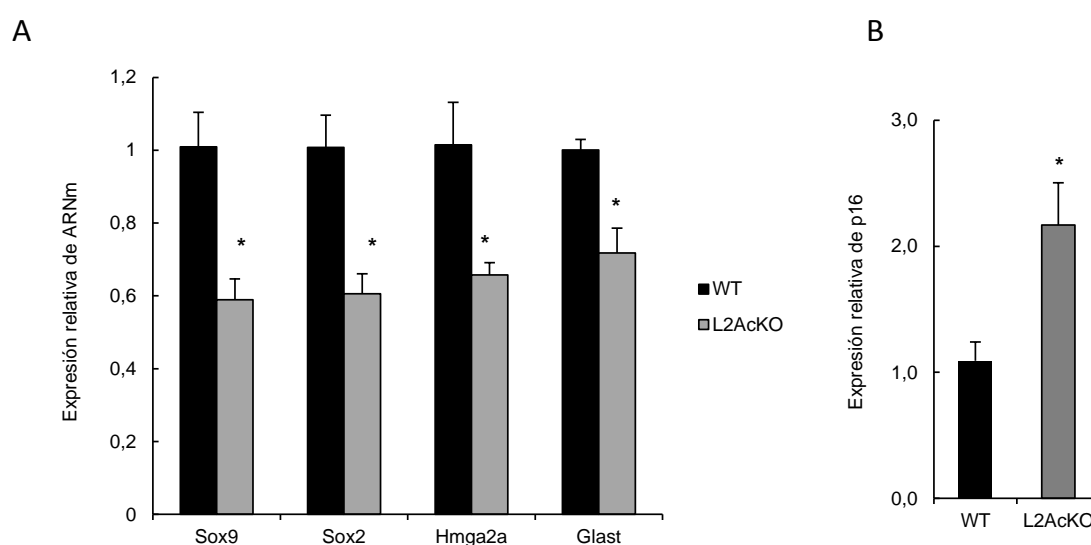


Figura 26. Análisis de la expresión de SOX9 y marcadores de célula madre Sox2, Hmga2a, y Glast así como del marcador asociado a senescencia p16 en el tejido *ex vivo* de la SVZ de ratones *wt* y L2AcKO. Los niveles del ARNm de los distintos genes fueron normalizados respecto a los niveles del mensajero del gen que codifica la β -Actina, y fueron referidos a los niveles obtenidos de ratones *wt*. Las barras representan la media de los resultados y el EEM (n=3). Test *t* de Student. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Interrelación entre CMA y la vía p38-MAPK con SOX9

Los últimos resultados demuestran que cada uno por su lado, tanto CMA como la vía de p38-MAPK, tienen un papel en el crecimiento y auto-renovación de las NSC. Más concretamente la ausencia o inhibición de CMA disminuye la capacidad de formación de neuroesferas asociado a una menor expresión de Sox9 y Sox2, mientras que la ausencia o inhibición de p38 refleja un fenotipo totalmente opuesto: las NSC crecen más y se observan mayores niveles de Sox9 y

Resultados

Sox2. Para determinar la interrelación entre ambos procesos, CMA y vía p38-MAPK, se estudiaron los niveles de las proteínas Lamp2A y p-p38 en los diferentes tratamientos realizados (Figura 27). Se observa que bajo el efecto de rapamicina en neuroesferas envejecidas, los niveles de Lamp2A se incrementan mientras que los de p-p38 disminuyen respecto al control del tratamiento (Figura 27A). En el caso del tratamiento con cloroquina ocurre lo contrario, al bloquearse los lisosomas se inhibe el proceso de CMA y los niveles de p-p38 aumentan (Figura 27B). Finalmente, bajo el tratamiento del inhibidor de p-p38 (PH797804) los niveles de esta proteína disminuyen como consecuencia del efecto de dicho inhibidor, y en este caso no se observan cambios en los niveles de expresión de Lamp2A (Figura 27C). En conjunto, los resultados sugieren que la vía p38-MAPK está por debajo del proceso de CMA. Estos datos indican que la actividad de p38 está mediada por la autofagia y sin embargo CMA no está regulado por p38. En otras palabras, parece que CMA estaría por encima de la vía de p38-MAPK.

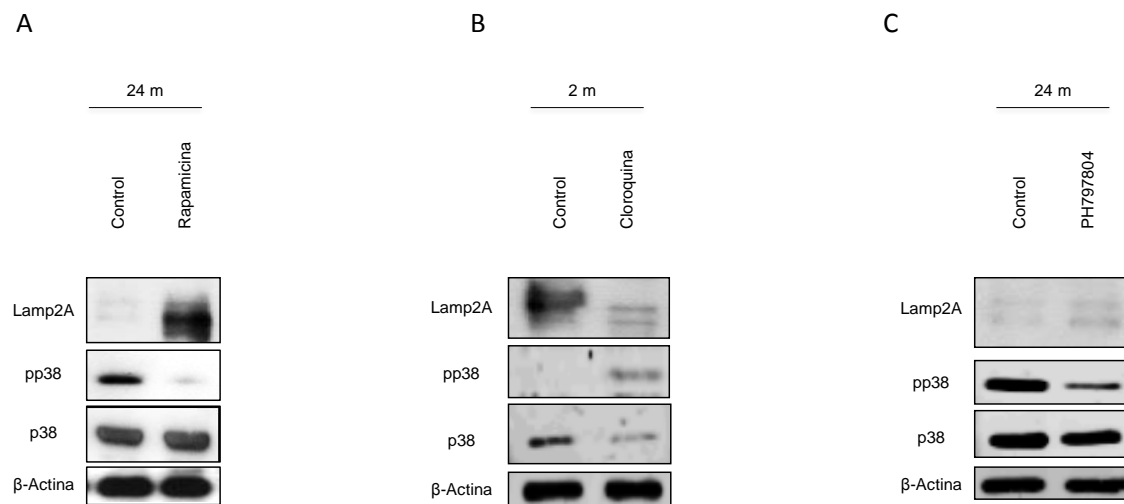


Figura 27. Análisis de la expresión de Lamp2A y p-p38 en los diferentes tratamientos en las neuroesferas. Western blot de las proteínas Lamp2A, p-p38 y p38 en muestras de neuroesferas bajo los distintos tratamientos. **(A)** NSC envejecidas tratadas con 2nM de Rapamicina. **(B)** NSC procedentes de ratones jóvenes tratadas con 20 μ M de Cloroquina. **(C)** NSC procedentes de ratones envejecidos tratadas con el inhibidor de p-p38 PH797804 2 μ M. Todos los tratamientos se realizaron durante 7 días. Los niveles de la β -Actina se emplearon como control de carga en todos los casos.

MKK6 como sustrato de CMA en el mecanismo de rejuvenecimiento de SOX9 en NSC

Los resultados hasta el momento indican que por un lado, SOX9 activa directamente Lamp2A, aumentando la actividad de CMA, y por otro, que disminuye los niveles de p-p38. Hay estudios que han descrito que los niveles de p38 regulan los marcadores de senescencia p16 y p19 (Wong, 2009), por lo que este mecanismo podría estar implicado en la transición desde la quiescencia a la senescencia de las NSC con el envejecimiento. Como nexo de unión entre ambos procesos se postularon varias proteínas como MKP1, MKK3, MKK6 o incluso el propio p38. Lo primero que se estudió fue si estas proteínas candidatas presentan en su secuencia el motivo KFERQ necesario para la degradación por CMA. Ninguna de las candidatas presentan dicha secuencia, pero en cambio la proteína MKK6, una quinasa de especificidad dual que activa a p38 (Han J, 1996), se observó que puede llegar a exponer dicha secuencia señal cuando es fosforilada en un residuo de tirosina (Figura 28), actualmente no descrito (únicamente se ha descrito hasta el momento la fosforilación de MKK6 en residuos de serina y treonina).

```
MSQSKGKKRNPGKIPKEAFEQPQTSTPPRDLSKACISIGNQNFVKAADDLEPIME
LGRGAYGVVEKMRHVPSSQIMAVKRIRATVNSQEQKRLMDLDISMRTVDCPFTVT
FYGALFREGDVWICMELMDTSLDKFYKQVIDKGQTIPEDILGKIAVSIVKALEHLHLSKLS
VIHRDVKPSNVLINALGQVKMCDFGISGYLVDSVAKTIDAGCKPYMAPERINPELNQK
GYSVKSDIWSLGITMIELAILRFPYDSWGTPFQQLKQVVEEPPQLPADKFSAEFVDFT
SQCLKKNSKERPTYPELMQHPFFTLHESKGTDVASFVKLILGD
```

Figura 28. Secuencia de aminoácidos de la proteína MKK6. Se muestra (en rojo) la secuencia de 5 aminoácidos que de ser fosforilada en su residuo tirosina, pasaría a tener la secuencia señal KFERQ necesaria para la degradación por CMA.

Para determinar si MKK6 es sustrato de CMA, se realizaron ensayos con MEFs en los que se inhibió por una parte la degradación lisosomal mediante NH_4Cl (20 mM) y leupeptina (0.1 mM), y por otra la degradación proteasomal con Mg132 4 μM . Para diferenciar entre MA y CMA dentro de la degradación por autofagia, se utilizaron además de los MEFs *wt*, MEFs L2AcKO. Mediante western blot se observó que la expresión de MKK6 se acumula en las líneas deficientes en CMA, sugiriendo que debido a la ausencia de dicho proceso, MKK6 no se puede degradar y en consecuencia se acumula. En cambio, se observa en estos resultados que SOX9 y p-p38 se degradan mediante el sistema proteasomal. En todos los experimentos realizados se utilizó p62 como control de eficiencia de inhibición lisosomal al ser degradada por MA (Figura 29A).

Resultados

Además de en el modelo de MEFs, se realizó este mismo ensayo en NSC *wt*, para determinar que no existían variaciones entre modelos celulares y que MKK6 se degrada por autofagia (Figura 29B). Los resultados obtenidos demostraron que en este modelo MKK6 también presentaba una acumulación de su proteína cuando el proceso de autofagia era inhibida durante 12 horas. (Figura 29B).

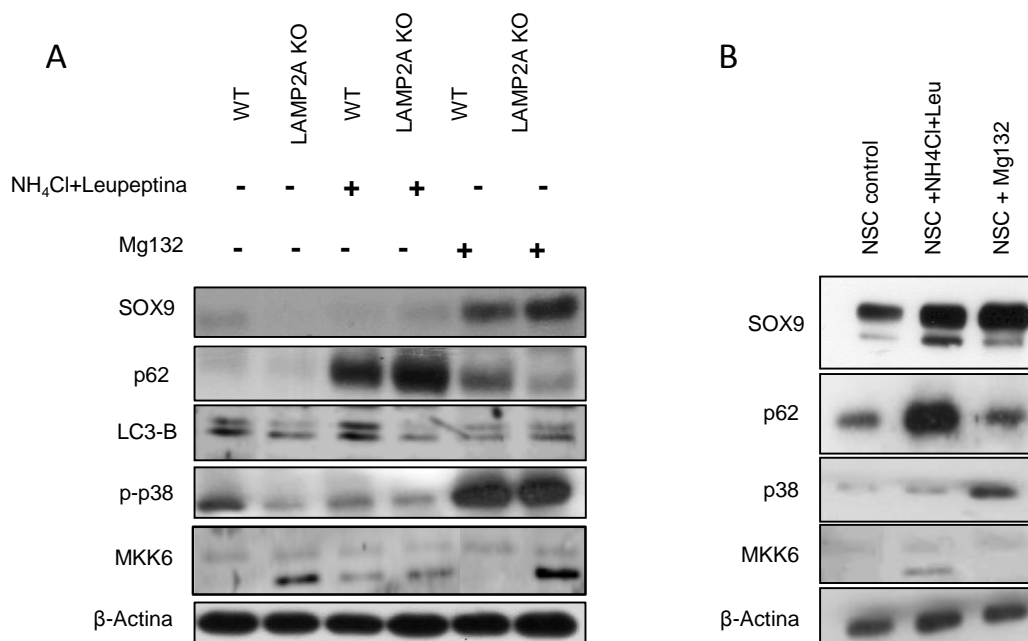


Figura 29. MKK6 se degrada por CMA tanto en MEFs como en NSCs. (A) Western blot de las proteínas SOX9, p62, p-p38 y MKK6 en muestras de MEFs *wt* y L2AckO tratados con inhibidores de autofagia (NH₄Cl 20 mM y leupeptina 0.1 mM) y de proteasoma (Mg132 4 μM) durante 12h. **(B)** Inmunoblot de muestras de NSC de ratones jóvenes tratadas con inhibidores de autofagia y de proteasoma a lo largo de 12h. En ambos casos los niveles de la β-Actina se emplearon como control de carga.

Finalmente se estudiaron por WB los niveles de MKK6 en las muestras de NSC jóvenes, y envejecidas infectadas con GFP y SOX9 (Figura 30A). Se pudo comprobar que los niveles de MKK6 son mayores en las NSC envejecidas infectadas con GFP que en las muestras de NSC jóvenes y las envejecidas infectadas con SOX9 (al igual que ocurre con p-p38). Se estudiaron además los niveles de MKK6 y p-p38 en las muestras de NSC L2AckO, donde se observó que los niveles de ambas proteínas son mayores en las L2AckO en comparación con las NSC *wt* (Figura 30B).

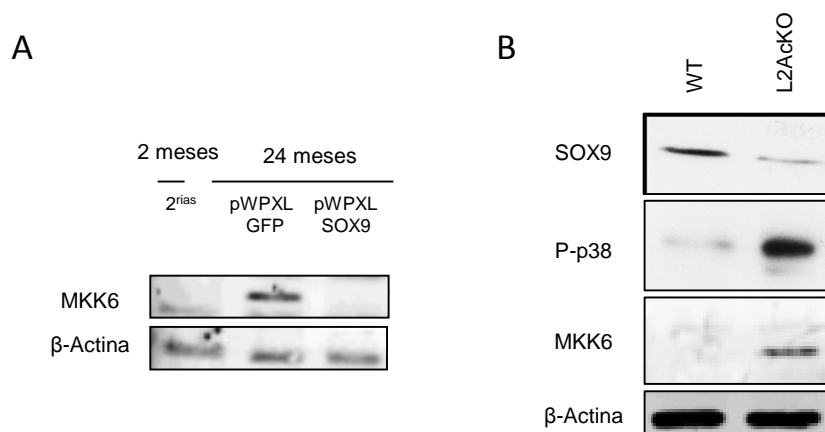


Figura 30. Relación de MKK6 y SOX9 en NSC envejecidas y L2AcKO. (A) Comparativa de los niveles de expresión de MKK6 en NSC jóvenes, envejecidas infectadas con GFP y con SOX9 a nivel de proteína mediante western blot. **(B)** Inmunoblot donde se compara la expresión de las proteínas SOX9, p-p38 y MKK6 en muestras NSC wt y L2AcKO. En ambos casos los niveles de la β-Actina se emplearon como control de carga.

5. DE NSC a GSC, la implicación de SOX9 en cáncer

Además del mantenimiento de las NSC, se conoce que la expresión de SOX9 está aberrantemente elevada en multitud de tumores, y desarrolla un papel oncogénico importante en ellos y en particular en glioblastoma (Matheu, 2012; Swartling FJ, 2012), por lo que además de intentar describir su función en el envejecimiento de las NSC, nos centramos en la función que SOX9 puede tener en las células madre glioma (GSC), que surgen, en algunas condiciones, como consecuencia de la transformación de las NSC.

Altos niveles de SOX9 se correlacionan con altos niveles de SOX2 en GSCs y muestras humanas de glioma

Se analizó la expresión de SOX9 a nivel de ARNm en una cohorte humana de muestras de GBM y se comparó con muestras de tejido cerebral sano. Se observa que la expresión es significativamente mayor en las muestras glioblastoma, hasta el punto de que la expresión de SOX9 es de hasta 6 veces mayor y que además, estos elevados niveles se correlacionan con elevados niveles de SOX2 (Figura 31A). Se observó que el 65% de los tumores presentan una sobre-expresión de SOX9, mientras que el 70% de ellos tiene niveles altos de SOX2. Mediante

Resultados

un análisis de correlación (test de Fisher) se determinó que la asociación entre la expresión de ambos genes es significativa (Figura 31B).

Se establecieron dos líneas GSCs derivadas de cultivos primarios de pacientes humanos, para lo cual, las células procedentes de biopsias fueron cultivadas en medio selectivo con factores de crecimiento (EGF y bFGF) durante varias semanas. De esta forma se obtuvieron dos cultivos independientes, GB1 y GB2, que eran capaces de crecer en forma de tumores esferas, tenían características de multipotencia y eran capaces de formar tumores cuando eran inyectados intracranalmente en ratones inmunodeprimidos (Figura 31C). Se estudiaron los niveles de SOX9 y SOX2 bajo condiciones de diferenciación (en ausencia de factores de crecimiento y en presencia de 1% de suero) y se observó que los niveles tanto de SOX9 como de SOX2 disminuyen significativamente (Figura 31D).

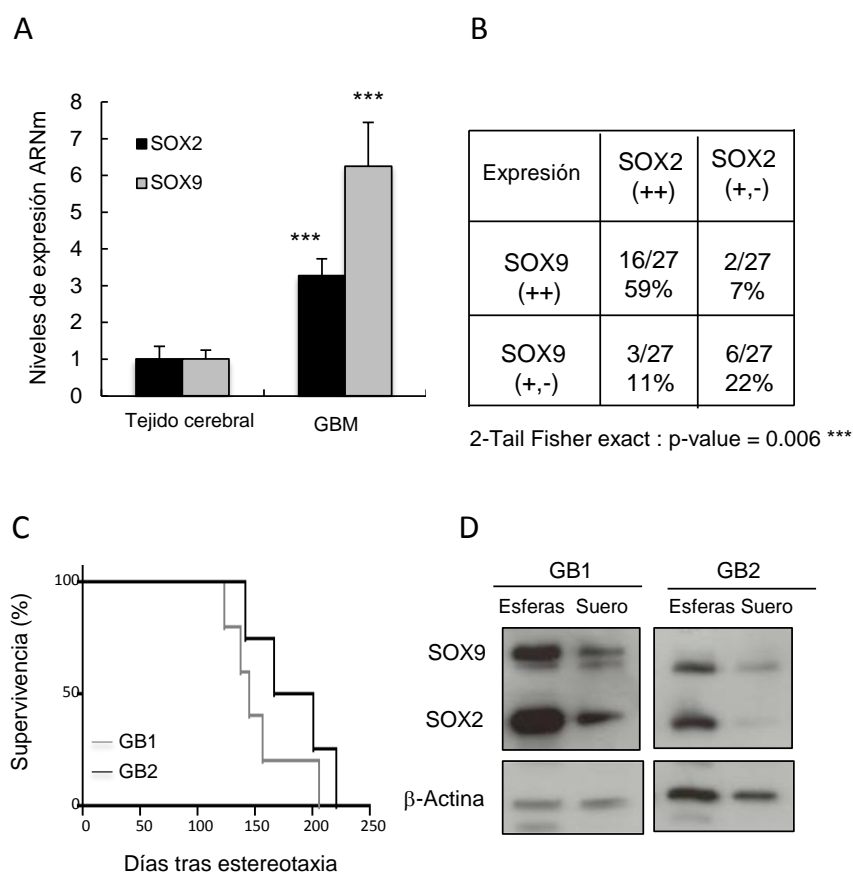


Figura 31. Co-expresión de SOX9 y SOX2 en glioblastoma humano y GSCs. (A) Se estudiaron los niveles de SOX9 y SOX2 en una cohorte de GBM (n=27) tomando tejido cerebral sano como control (n=9). Las barras representan la media de los resultados y el EEM. Test t de Student.*** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05. **(B)** Asociación de la expresión de SOX9 y SOX2 en GBM humano. Fisher Exact Test.* <0.02. **(C)** Curva Kaplan-Meier de supervivencia de ratones NOD-SCID xenotransplantados con las líneas GSCs GB1 y GB2 (n=4). **(D)** Western blot de los niveles de SOX9 y SOX2 en las líneas GBs cultivadas en medio NSC y en medio de diferenciación, en ausencia de factores de crecimiento y en presencia de 1% de suero.

6. Mecanismos implicados en la función de SOX9 en glioma: MKP1

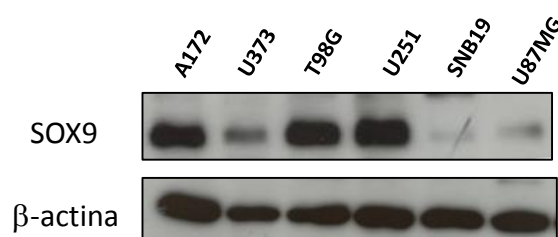
Dado que hemos visto que SOX9 regula la vía p38-MAPK en las NSC y esta vía juega un papel relevante en GBM (Sooman et al. 2013), consideramos de interés y priorizamos el estudio en los reguladores de p38. Varios estudios han descrito que la fosfatasa dual MKP1, cuya función está asociada a la inhibición negativa de las MAPK, juega un papel fundamental en distintos tipos de tumores como por ejemplo colon, próstata, vejiga, mama o CNMP (Keyse SM, 2007; Wang, 2003), pero hasta el momento se desconoce su posible función en GBM. Por ello empezamos a caracterizar la expresión de MKP1 en glioblastoma.

Correlación inversa entre la expresión de SOX9 y MKP1

Con el fin de determinar la existencia de una posible relación entre SOX9 y MKP1, se analizaron los niveles de MKP1 en líneas tumorales de glioma con ganancia y pérdida de función de SOX9. Estas líneas habían sido modificadas mediante infecciones lentivirales con los plásmidos de sobre-expresión y/o de inhibición de SOX9 (junto a sus respectivos controles). La línea U251 que presenta niveles elevados de SOX9, fue infectada con el shSOX9; la U373 al presentar niveles intermedios de SOX9, fue infectada con ambos tipos de vectores y finalmente la U87 que presenta niveles basales bajos de SOX9, fue infectada con el vector de sobre-expresión para SOX9 (Figura 32).

Los resultados muestran que existe una correlación inversa entre la expresión de ambas proteínas. Así, en la línea U251 con niveles del 50% de SOX9 frente a la condición control (pLKO), la expresión de MKP1 aumenta 3.6 veces. De la misma forma ocurre en la línea U373: cuando se inhibe la expresión de SOX9 (un 80% menos), los niveles de MKP1 se duplican. Por el contrario, cuando se elevan los niveles de SOX9, la expresión de MKP1 disminuye un 45% y un 53% en U373 y U87 relativa al control. Estos datos indican que SOX9 está ejerciendo de alguna manera un efecto directo sobre MKP1 en este tipo de tumores.

A



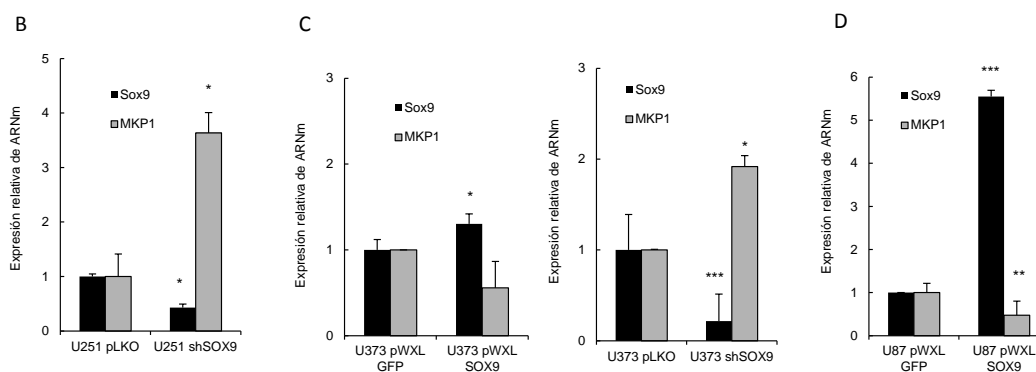


Figura 32. Correlación inversa entre la expresión de MKP1 en líneas celulares de GBM con ganancia y pérdida de SOX9. Los niveles del ARNm de los genes Sox9 y MKP1 fueron estudiados mediante qRT-PCR a partir de líneas diferenciadas de GBM previamente infectadas con los plásmidos de sobre-expresión o de inhibición de la expresión de SOX9. **(A)** Niveles de expresión de SOX9 a nivel de proteína en las distintas líneas células de GBM. **(B)** Expresión de SOX9 y MKP1 en la línea U251 control (pLKO) y con inhibición parcial de la expresión de SOX9, **(C)** en la línea U373 tanto con sobre-expresión (pWXL GFP como control de sobre-expresión) como con inhibición de SOX9, y **(D)** U87 con sobre-expresión de SOX9 respecto a su control (pWXL GFP). Todos los valores fueron normalizados con los niveles del mensajero del gen que codifica la enzima GAPDH, y referidos a los niveles obtenidos en su respectivo control de infección. Las barras representan la media de los resultados y el EEM (n=3). Test *t* de Student. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Las líneas diferenciadas y CSC de GBM presentan niveles bajos de MKP1

A continuación, se analizó la expresión de MKP1 en las distintas líneas diferenciadas de GBM así como líneas CSC mediante qRT-PCR (Figura 33). Se observó que la expresión en líneas diferenciadas era baja, llegando a presentar niveles por debajo del 50% en relación al tejido cerebral sano. En las líneas CSC (GB1, GB2, GNS166 y GNS179) se observó que los niveles eran todavía más bajos que los de las líneas diferenciadas, llegando a estar por debajo del 90% de los niveles del tejido sano. En todos los casos estas diferencias fueron estadísticamente significativas y confirman que los niveles de MKP1 están silenciados o son muy bajos en las CSCs. En estos casos también existe una correlación inversa con la expresión de SOX9 que está aumentada en estas condiciones (datos no mostrados).

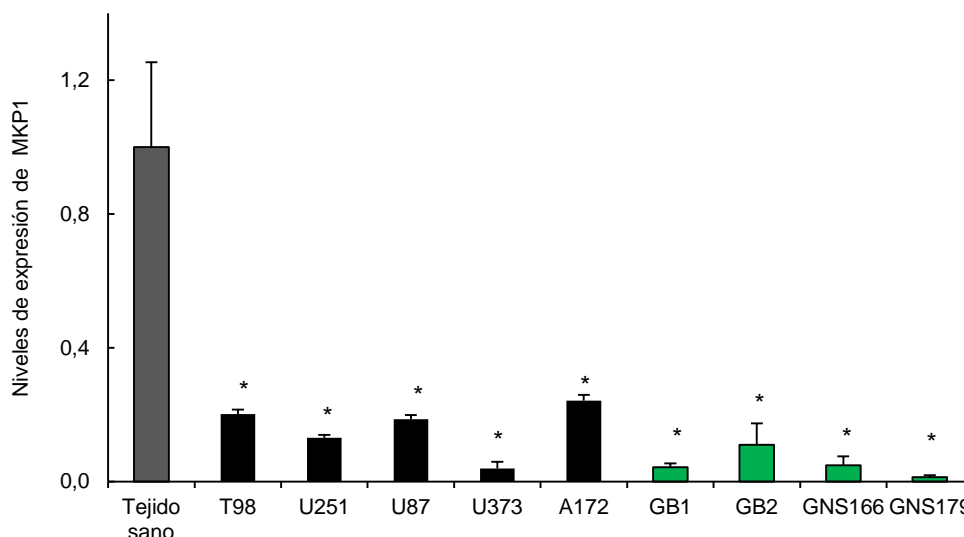


Figura 33. Las líneas diferenciadas y CSC de GBM presentan niveles bajos de MKP1 Los niveles del ARNm de MKP1 fueron estudiados mediante qRT-PCR a partir de líneas diferenciadas de GBM, líneas CSC generadas de pacientes y a su vez normalizados con los niveles del mensajero del gen que codifica la enzima GAPDH, y referidos a los niveles obtenidos de tejido cerebral sano. Las barras representan la

7. Caracterización de MKP1 en GBM

Expresión de MKP1 en muestras de pacientes con GBM

Se procedió al estudio de la expresión de MKP1 en muestras de pacientes con gliomas de diferentes grados de dos cohortes independientes: una del Hospital de la Fe en Valencia, y la otra del Hospital Universitario Donostia (HUD). El porcentaje de casos MKP1 positivos (considerándose como positivo la expresión del doble de veces la del tejido sano) en los gliomas de grado II y III era de 0.07% en la cohorte de Valencia. En ambos grupos los pacientes con tumores de mayor grado (GBM) presentaron mayores niveles de expresión de MKP1, siendo 54,5% para la cohorte de Valencia y 44% para la de San Sebastián. Además, junto con las muestras del Hospital de la Fe se incluyeron distintas líneas tumorales de GBM (A172, U87, U373 y T98) que, como se había observado anteriormente, presentaban niveles bajos de MKP1 (Figura 34).

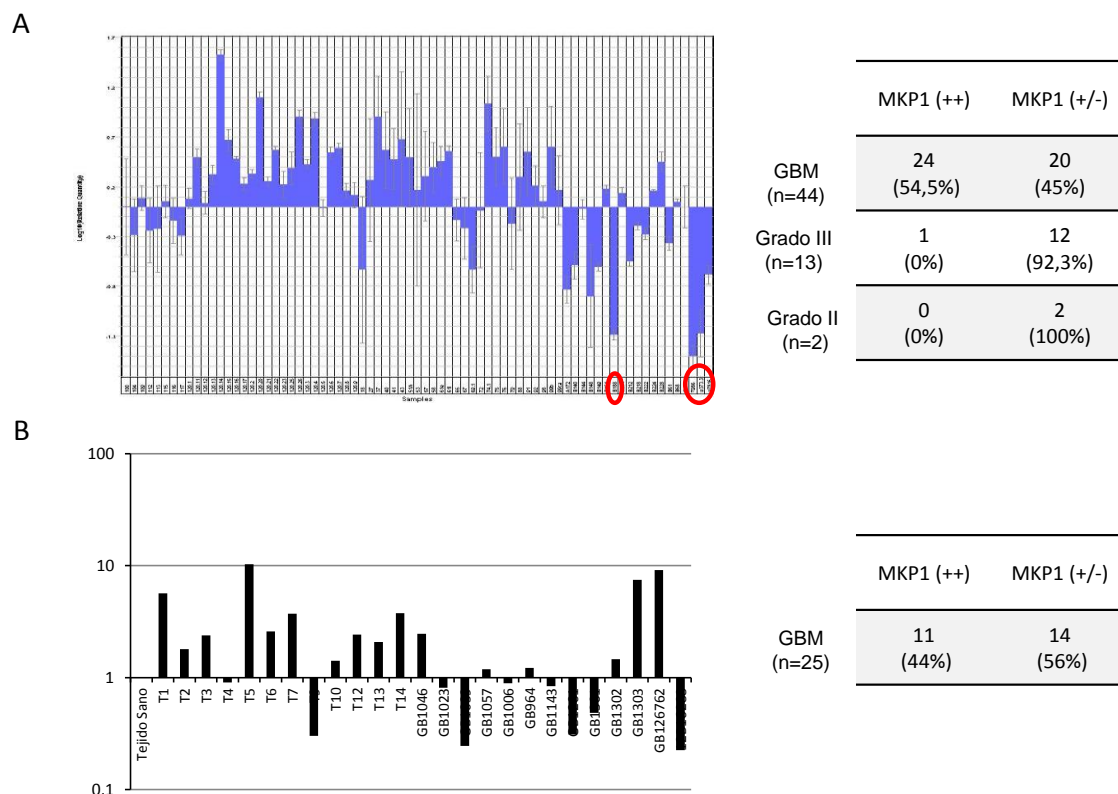


Figura 34. Niveles de expresión de MKP1 en muestras de pacientes con GBM. Se estudiaron los niveles de MKP1 en dos cohortes independientes de GBM tomando tejido de cerebro sano como control (n=6). **(A)** Cohorte del Hospital de la Fe de Valencia (n=59) y su cuantificación. Entre las muestras se incluyen gliomas de distintos grados y cuatro líneas celulares de GBM (en rojo). **(B)** Cohorte del Hospital Universitario de Donostia (n=25) y su cuantificación. Esta cohorte únicamente incluye muestras de GBM. Las barras representan la media de los resultados y el EEM. Test t de Student. *** p<0,001; ** p<0,01; * p<0,05.

Una vez analizada la expresión se realizó una curva Kaplan Meier de supervivencia en relación con los niveles de MKP1 obtenidos de cada paciente. Se dividieron los pacientes en dos grupos en función de los niveles de MKP1: por un lado los que presentaban una expresión superior a la de dos veces la del tejido sano, y por otro lado los pacientes cuyos niveles de MKP1 eran inferiores a 1.5 veces la expresión del tejido sano. Los resultados asocian una mayor expresión de MKP1 con una mayor supervivencia de los pacientes en ambas cohortes. En ambos casos la diferencia es estadísticamente significativa (Figura 35). En este caso, de manera opuesta a otros tipos tumorales, la sobre-expresión de MKP1 se asocia a mayor supervivencia.

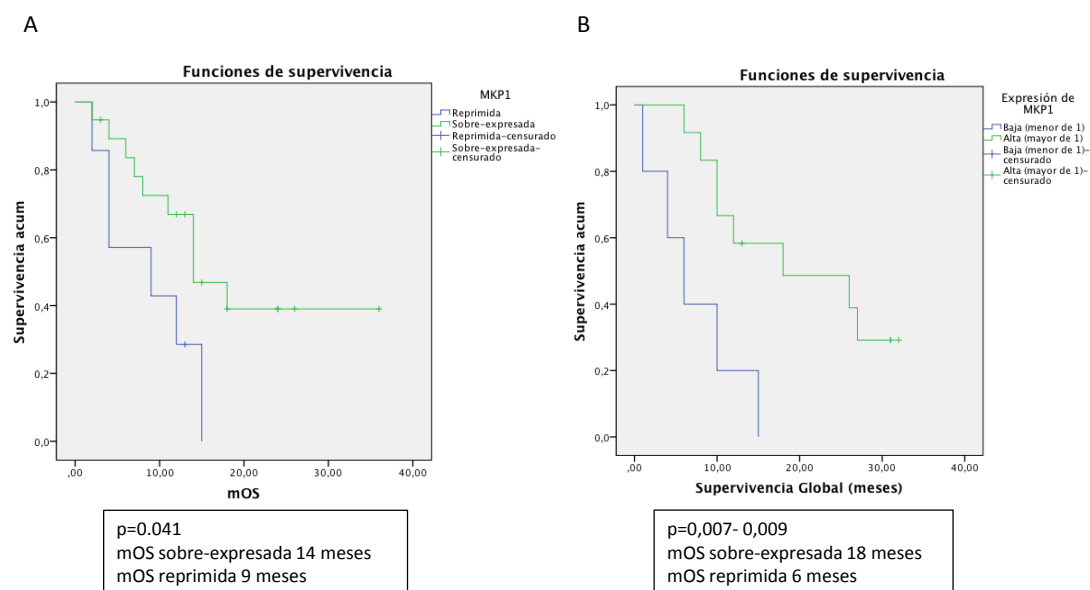


Figura 35. Los pacientes con niveles elevados de MKP1 sobreviven más. Curva de Kaplan-Meier representando la supervivencia de los pacientes de **(A)** la cohorte del Hospital de la Fe, y **(B)** Hospital Universitario Donostia, ambas asociadas a los niveles de expresión de MKP1. El punto de corte entre los pacientes con niveles altos de expresión de MKP1 fue de 2 veces la expresión respecto a la de los tejidos sanos.

Sobre-expresión de MKP1 en líneas celulares de GBM

Dado que los niveles endógenos de MKP1 en líneas GBM son bajos, se procedió a su sobre-expresión en U87 y U373 retrovirus portadores de los plásmidos pLXSN (como vector vacío) y pLXSN CL100 (con sobre-expresión de MKP1), tras lo cual se inició el estudio de ensayos funcionales.

Se midió la capacidad proliferativa de las distintas líneas mediante el estudio de crecimiento celular al cabo de 72 horas así como a través de la expresión del marcador de mitosis P-H3 por inmunofluorescencia. Los resultados muestran una disminución en la capacidad proliferativa del 87% y del 44% para la U87 y U373 respectivamente (Figura 36B). El número de células P-H3 positivas también presenta disminuye de manera significativa en ambas líneas con niveles elevados de MKP1 respecto a las control (Figura 36C).

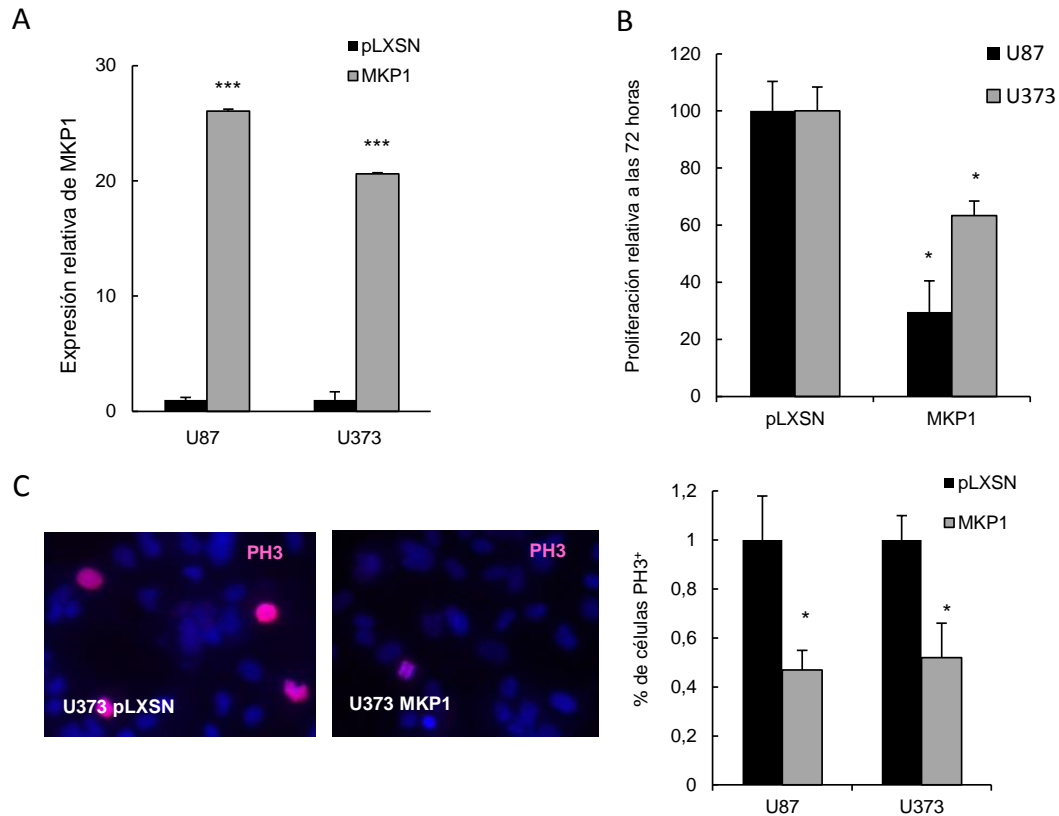


Figura 36. La sobre-expresión de MKP1 disminuye la capacidad proliferativa de las líneas U87 y U373. (A) Medida de la expresión de MKP1 mediante qRT-PCR en ambas líneas 48h tras la infección retroviral con los plásmidos pLXSN (control) y MKP1 (sobre-expresión de MKP1). (B) Ensayo de la capacidad proliferativa al cabo de 72h de las líneas U373 y U87 con reactivación ectópica de MKP1. Cada barra representa el promedio del crecimiento relativo al control y el EEM de experimentos independientes (n=2 para U87 y n=3 para U373) (C) Estudio de la expresión de fosfo-histona H3 (P-H3, en rojo) mediante inmunofluorescencia en >50 células en al menos 4 campos diferentes. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra calibradora. 20 μ m.

A continuación, se midió la capacidad de formación de tumoresferas bajo condiciones de célula madre (en presencia de factores de crecimiento EGF y bFGF y en ausencia de suero). Siguiendo el protocolo de formación de esferas citado anteriormente, se observó que tanto en la línea U87 como en la U373 las células con sobre-expresión de MKP1 formaban un menor número en comparación con las células control, sobre todo en la U87 donde se observó un número medio de 16 esferas respecto al control que formó una media de 41 (Figura 37A). Se procedió a la formación de tumoresferas secundarias con el fin de estudiar cómo afecta el incremento de MKP1 a la capacidad de auto-renovación. Se determinó que la U87 forma una media de 14 esferas menos que su control (4 frente a 18 esferas), mientras que la U373 con niveles elevados de MKP1 formó una media de 3 en comparación con su respectivo control que formó 6. Las diferencias en ambas líneas son estadísticamente significativas y demuestran

que la sobre-expresión de MKP1 disminuye la capacidad de formación de tumoresferas (Figura 37B).

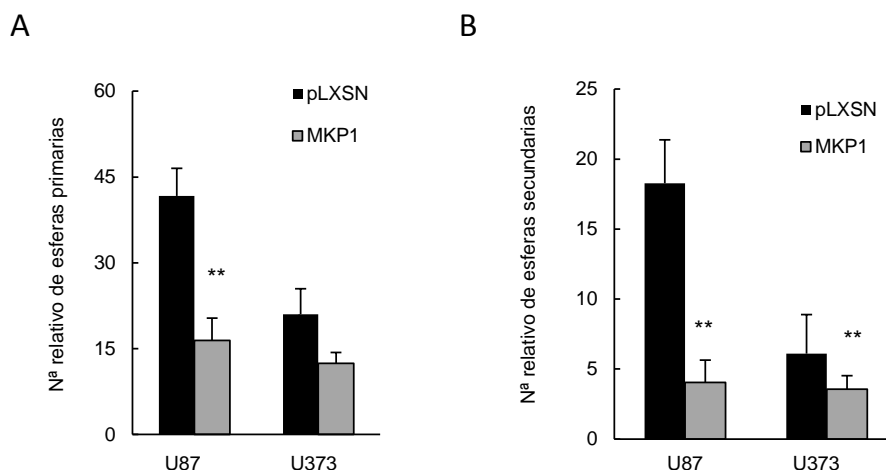


Figura 37. La activación ectópica de MKP1 disminuye la formación de tumoresferas *in vitro*. (A, B) Medida de la capacidad de formación de esferas (A) primarias y (B) secundarias por cada 500 células en medio selectivo carente de suero y en presencia de factores de crecimiento. Cada barra representa el promedio de número de esferas relativo al control y el EEM de experimentos independientes (n=2). Las barras representan la media de los resultados y el EEM. Test t de Student.*** p<0.001; ** p<0.01; * p>0.05.

Caracterización de MKP1 en líneas CSC

Se procedió a la caracterización de MKP1 en las líneas GSC disponibles en el laboratorio (GB1, GB2, GNS166 y GNS179). Mediante qRT-PCR se midieron los niveles de SOX9 y MKP1 en el estado no diferenciado (o CSC) de las líneas así como cuando eran sometidas a un proceso de diferenciación basado en la adhesión y ausencia de factores de crecimiento durante 7 días (Figura 38). Los resultados mostraron cómo los niveles de MKP1 son bajos en todas líneas CSC y que se ven aumentados cuando las líneas son sometidas al proceso de diferenciación, sobre todo en la GB1 donde se observa un aumento de más de 30 veces la expresión observada en su respectiva CSC. Salvo en la GB2, en el resto de líneas este aumento en la expresión de MKP1 resultó ser estadísticamente significativo. Los niveles de SOX9 en cambio disminuyen cuando estas líneas entran en diferenciación, siendo esta diferencia significativa para todas las líneas salvo para la GNS179. Nuevamente, se observa una correlación inversa entre la expresión de SOX9 y MKP1.

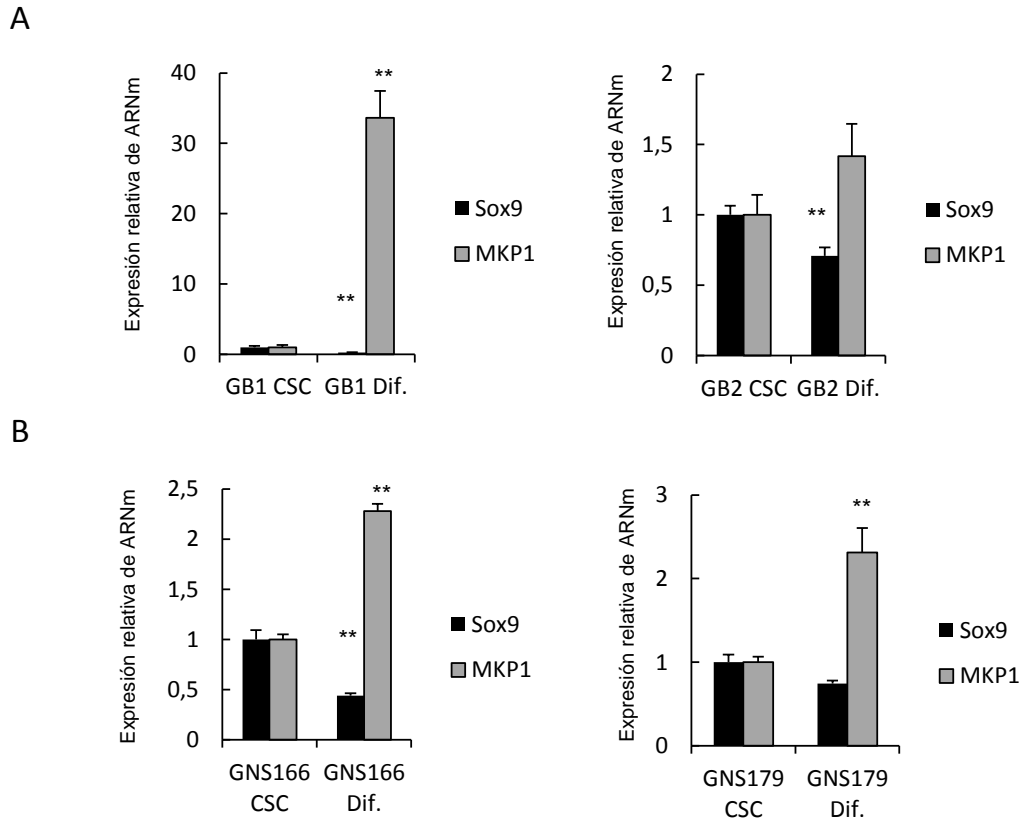


Figura 38. La expresión de MKP1 es baja en las CSC, pero aumenta cuando éstas entran en diferenciación. Los niveles del ARNm de los genes SOX9 y MKP1 fueron estudiados mediante qRT-PCR a partir de las líneas establecidas GB1 y GB2 y las GNS (166 y 179), tanto en su estado de CSC como diferenciado. **(A)** Expresión de SOX9 y MKP1 en las líneas GB1 y GB2 establecidas a partir de pacientes con GBM, así como **(B)** en las líneas GNS166 y GNS179. Todos los valores fueron normalizados con los niveles del mensajero del gen que codifica la enzima GAPDH, y referidos a los niveles obtenidos en el estado CSC de cada línea. Las barras representan la media de los resultados y el EEM (n=3). Test *t* de Student. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Se procedió a la sobre-expresión de MKP1 en las líneas célula madre de glioma neuronal (GNS), GNS166 y GNS179, mediante infección retroviral de los plásmidos pLXSN como vector vacío y pLXSN CL100 como sobre-expresión de MKP1. Al igual que con las líneas diferencias, fueron seleccionadas con G418 y al cabo de 72h se verificaron los niveles de MKP1 a nivel de ARNm. Se pudo comprobar que los niveles de MKP1 habían aumentado 16 veces en GNS166 y 30 veces en GNS179 respecto a sus respectivos controles (Figura 39A). Una vez infectadas, se llevó a cabo un ensayo de proliferación, contando el número total de células a día 1, 3 y 5 post-infección. Como se muestra en la figura 38B, en las dos líneas con niveles elevados de MKP1 la proliferación disminuye: en la GNS166 la disminución relativa al control es mayor a día 3 con un 37% de descenso en el crecimiento (20% y 21% para los días 1 y 5 respectivamente). La línea GNS179 muestra unas diferencias más marcadas, con un descenso del 45% en los días 1 y 3, y hasta un 60% en el quinto día post-infección (Figura 39B). Se estudió la expresión del

marcador de mitosis P-H3 por inmunofluorescencia y se observó que tanto la GNS166 como la GNS179 con sobre-expresión de MKP1 presentan menores niveles de este marcador que sus respectivos controles, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Figura 39C). Estos datos confirman que la expresión de MKP1 regula la capacidad proliferativa de las células madre de glioma.

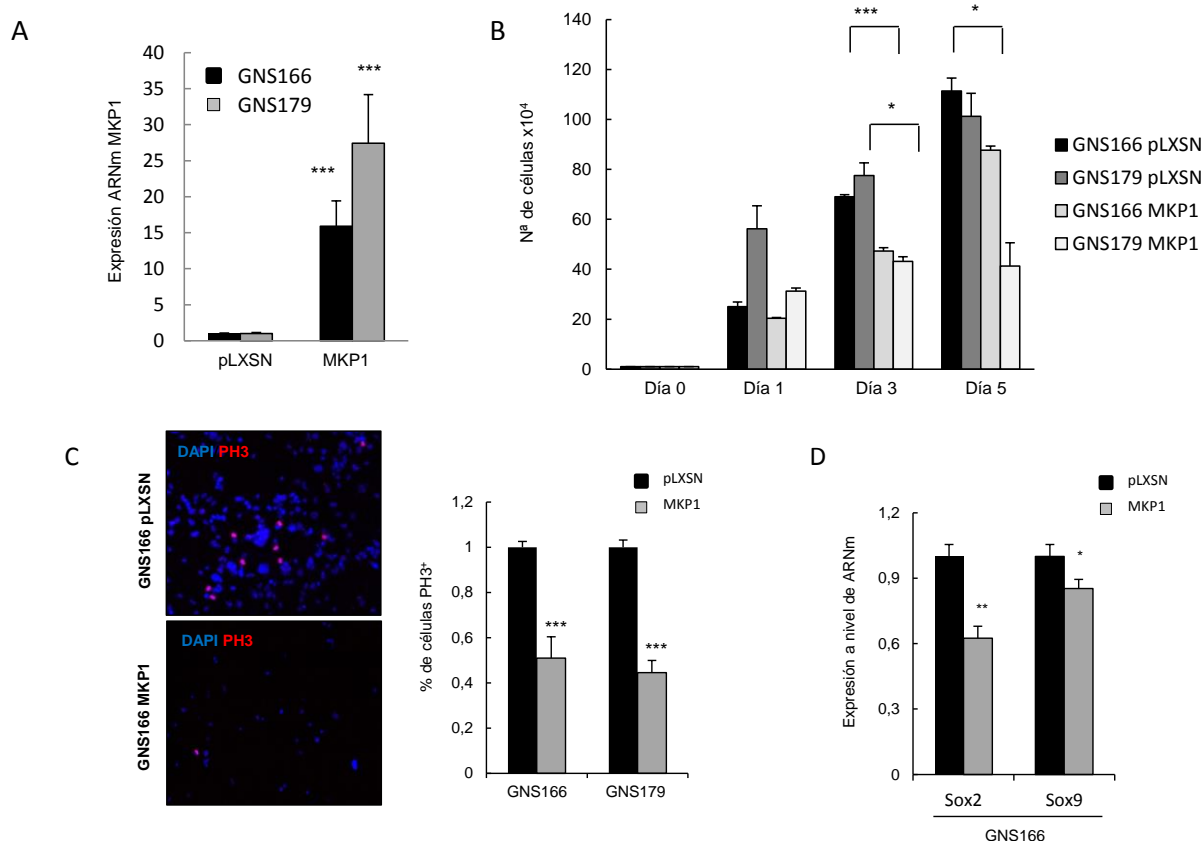


Figura 39. La sobre-expresión de MKP1 disminuye la capacidad proliferativa de las líneas CSC. (A) Medida de la expresión de MKP1 por medio de qRT-PCR en ambas líneas 48h post-infección. **(B)** Estudio de la proliferación al cabo de los días 1, 3 y 5 por cada 10.000 células. Cada barra representa el promedio del crecimiento relativo al control y el EEM de experimentos independientes (n=2 para GNS179 y n=3 para GNS166) **(C)** Estudio de la expresión de fosfo-histona H3 (P-H3, en rojo) mediante inmunofluorescencia en >50 células en al menos 4 campos diferentes. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Aumento 10x. **(D)** Análisis de expresión de Sox9 y Sox2 por ARNm en la línea GNS166 modulada con MKP1. Los niveles del ARNm fueron normalizados respecto a los niveles del mensajero del gen que codifica para GAPDH y fueron referidos a los niveles de la condiciones control. Test *t* de Student. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Inducción de diferenciación de las líneas GNS infectadas con MKP1

Las líneas GNS166 y GNS179 sobre-expresadas con MKP1 se sometieron al protocolo de diferenciación (cultivo en ausencia de factores) y al cabo de 7 días se incubaron con anticuerpos específicos para neurona (Tuj1) (Figura 40A), oligodendrocito (CNPase) y astrocito (GFAP), con el fin de poder identificar hacia qué tipo de linaje se diferencian en presencia y ausencia de MKP1. Mientras que no se detectaron a penas células positivas para CNPase ni GFAP en ninguna de las condiciones, se observó que el número de células Tuj1⁺ en ambas líneas aumenta en las condiciones de sobre-expresión de MKP1 (Figura 40). Más concretamente, se observó que la línea GNS166 pasa de no presentar ninguna célula Tuj1⁺ a que un 17% de las células con sobre-expresión de MKP1 lo sean. En la GNS179 en cambio, un 32% de las células control son ya Tuj1⁺, pero con la sobre-expresión de MKP1 pasan a ser un 58%. Estos datos sugieren que elevados niveles de MKP1 provocan diferenciación celular.

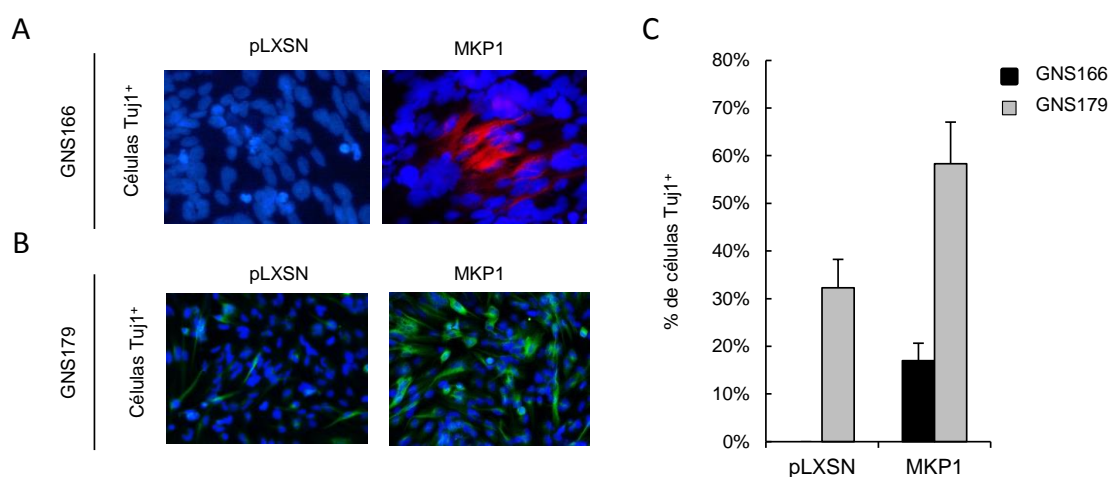


Figura 40. Caracterización inmunocitoquímica de la diferenciación a los distintos linajes neurales. Caracterización cualitativa del cultivo de diferenciación de las 2 condiciones para cada línea CSC. **(A)** microfotografías de la inmunotinción para Tuj1 (rojo) y DAPI (azul) de la infección de la línea GNS166. **(B)** inmunocitoquímica para Tuj1 (verde) y DAPI (azul) de la línea infectada GNS179. **(C)** Cuantificación del número de células positivas para el marcador neuronal Tuj1. Aumento 20x.

Por último, se estudió la capacidad de formación de tumores *in vivo*. Se inyectó la línea U87, U87 pLXSN y la U87 con sobre-expresión de MKP1 de forma subcutánea en ratones inmunodeprimidos. A día 26, los tres animales inyectados con células control formaron tumores de un tamaño similar (50 mm³), mientras que los animales donde se habían inyectado

las células con sobre-expresión de MKP1 no formaron ningún tumor (Figura 41A). Por otro lado, se inyectaron ortotópicamente las dos condiciones de la línea GNS166 (control y con elevado MKP1) en el cerebro de ratones NOD/SCID adultos mediante estereotaxia intracraneal. Estos ratones fueron monitorizados mediante un seguimiento que incluía medida de pérdida de peso así como un test de coordinación neuromuscular (*stepping test*). En el momento en el que los ratones mostraron signos de presencia de tumor fueron sacrificados. Aquellos animales inyectados con la línea GNS166 con sobre-expresión de MKP1 presentaron un retraso en los síntomas de aparición y progresión del tumor (Figura 41B).

A

	U87	U87 pLXSN	U87 MKP1
Tumores formados por inyección	8/8 100%	8/8 100%	0/8 0%

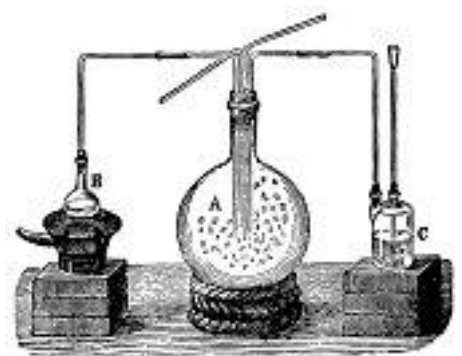
B

% de tumores (día 120)	
GNS166 pLXSN	GNS166 MKP1
100%	33%

Figura 41. La sobre-expresión de MKP1 disminuye la capacidad de formación de tumores *in vivo*. (A) Tabla resumen del número de tumores formados por inyección en cada condición experimental (línea U87 control n=1, U87 pLXSN n=2 y U87 MKP1 n=2). . **(B)** Curva Kaplan-Meier representando la supervivencia de ratones NOD-SCID xenotransplantados con la línea GNS166 pLXSN (n=2) y GNS166 con MKP1 (n=3).

Los datos demuestran que la sobre-expresión de MKP1 tanto en líneas de GBM como de GSC disminuye su capacidad proliferativa asociada a una mayor diferenciación. Todo esto se correlaciona con una menor capacidad de formación de tumores *in vivo*.

DISCUSIÓN



La zona subventricular (SVZ) del cerebro adulto es uno de los nichos donde se encuentran las células madre neurales, población con potencial para ser empleadas en terapia celular de enfermedades neurodegenerativas (Taupin 2006; Alvarez-Buylla et al. 2008; Doetsch et al. 1999).

En los primeros capítulos del apartado de resultados se han expuesto los estudios tanto a nivel *in vivo* como *in vitro*, dirigidos a caracterizar esta población de células madre de la SVZ de ratones de distintas edades. El propósito ha consistido en caracterizar la expresión del factor de transcripción SOX9 en el envejecimiento de estas células madre neurales, así como su implicación en los procesos de crecimiento celular y auto-renovación, propios de estas. De forma paralela, hemos estudiado y determinado los mecanismos y señales que participan en su regulación y mantenimiento a lo largo del envejecimiento. A través de la caracterización de las causas implicadas en su agotamiento en un futuro podrían ser utilizadas con fines asociados a terapia génica o farmacológica en las estrategias de regeneración de tejidos. Los datos presentados en el capítulo IV, demuestran la influencia que ejercen el proceso de autofagia y la vía de p38 dentro de las MAPK en la actividad de estas células madre neurales e identifica a SOX9 como una de las moléculas reguladoras del envejecimiento de dicha población.

1. SOX9 regula el envejecimiento de las células madre neurales

Diferentes estudios han demostrado una disminución de la capacidad neurogénica con la edad, fenómeno que puede ser explicado por un descenso o agotamiento del número de células madre neurales (NSC) en el cerebro (López-Otín et al. 2013; Luo et al. 2006). Por una lado, basándose en la capacidad de permanecer en un estado de quiescencia, la medida de retención del marcador BrdU permite la determinación *in vivo* del número de células madre adultas presentes en el tejido cerebral (Kippin et al. 2005; Wojtowicz & Kee 2006; Lugert et al. 2010). Nuestros resultados asocian esa disminución en el número de células madre en la SVZ de ratones envejecidos con una menor expresión de SOX9 en cada una de ellas, haciendo de SOX9 un posible biomarcador del envejecimiento de estas NSC. Por otro lado, el ensayo de formación de neuroesferas *in vitro* permite también estimar el número de NSC presentes en el tejido diseccionado y a su vez resulta una herramienta útil para su manipulación y estudio a diferentes niveles. En el nicho de la SVZ, aunque existe algún trabajo que apunta a que la edad no altera el número de NSC capaces de generar esferas (Bouab et al. 2011), multitud de autores defienden una reducción significativa del número de esferas primarias con la edad

(Maslov et al. 2004; Ahlenius et al. 2009). Nuestros datos están a favor de esta última observación, donde vemos que el rendimiento obtenido en el aislamiento de neuroesferas de la SVZ de animales viejos es menor que en el cultivo de animales jóvenes. Respecto a la capacidad de auto-renovación, la formación de neuroesferas secundarias fue, al igual que en las primarias, mayor en los ratones jóvenes respecto a los envejecidos. Esta mayor capacidad de proliferación y auto-renovación de las células de la SVZ de ratones jóvenes está además asociada a mayores niveles de SOX9 así como de SOX2, consistente con datos previos (Scott et al. 2010; Ellis et al. 2004), y a diferencia de estos, nuestros resultados demuestran que dichos niveles de expresión disminuyen en los cultivos de ratones envejecidos, acción que se había descrito en el caso de SOX2 en animales de mediana edad (Brazel et al. 2005). Además de esta correlación con la expresión de marcadores de células madre en la SVZ, también se observa una disminución de la expresión de Sox9 en el restante nicho de células madre, el giro dentado, así como en el nicho de células progenitoras procedentes de la SVZ, el bulbo olfatorio. A falta de determinar si en el resto de tejidos se observa este patrón tan claro de expresión de Sox9 con el envejecimiento, SOX9 podría ser un biomarcador al menos, de los nichos propios de célula madre.

Referente a la propiedad de auto-renovación, se ha descrito que existe un descenso en la velocidad de proliferación y auto-renovación a medida que aumenta el número de pases de cultivo y que esta disminución está asociada a una reducción de la tasa mitótica así como a una posible entrada en senescencia (Wright et al. 2006). Nuestros datos demuestran que, la formación de neuroesferas secundarias presenta un incremento en el número, pero es a partir de dicho pase cuando se produce un declive en la capacidad de formación tanto en número como en el tamaño de las mismas. Una de las razones por las que observamos este fenotipo puede estar asociada a una disminución gradual de los niveles de SOX9 con el incremento seriado del número de pases en cultivo.

En concordancia con estos datos, hemos determinado que animales *s-Ink4/Arf/p53* envejecidos forman un mayor número de neuroesferas en la SVZ que ratones *wt* de la misma edad *in vitro*, y que este aumento está asociado a una mayor expresión de marcadores de célula madre, entre los que se encuentran Sox9 y Sox2 en tejido *ex vivo*. Este incremento en el número de células madre neurales únicamente en los estadios envejecidos, sugiere que el incremento en la dosis génica de Ink4/Arf retrasa el envejecimiento de las células madre neurales. Este efecto puede justificar el alargamiento de la vida media y retraso del envejecimiento que presenta este modelo animal (Matheu et al. 2007). Dado que animales que sobreexpresan específicamente Ink4 apenas muestran diferencias en la proliferación de la

SVZ de ratones envejecidos (Molofsky et al. 2006), el efecto que los transgenes s-Ink4/Arf/p53 ejercen sobre las NSC puede ser debido a la actividad de la vía Arf-p53. Hay que tener en consideración que la total eliminación de p53 o de su diana p21, resulta en el agotamiento prematuro de actividad de las células madre neurales en estadios avanzados (Kippin et al. 2005; Meletis et al. 2006), y que el acortamiento de vida del animal por hiperactivación de p53 presenta un declive prematuro en la actividad de las NSC en la SVZ (Medrano et al. 2009). Además de este retraso en la disminución de las NSC asociado a la edad en los ratones transgénicos, se ha observado una mejora en el comportamiento, indicativo de un aumento de la actividad cerebral en estos animales. Estos ensayos sugieren que los animales s-Ink4/Arf/p53, además de presentar una mejor función muscular, desarrollan una mayor capacidad de exploración asociado a una menor ansiedad. Nuestros resultados demuestran que la regulación normal de p53 conlleva a un retraso en el deterioro cognitivo dado por el retraso en el agotamiento de las NSC (Carrasco-Garcia et al. 2015).

Tanto en las NSC envejecidas por edad como por pases en cultivo, hemos observado que existe una correlación directa entre el envejecimiento de las NSC y un descenso en los niveles de SOX9. Se procedió a la reactivación ectópica de este factor transcripcional en las NSC envejecidas con el fin de determinar la función de SOX9 en el mantenimiento de estas NSC a lo largo del envejecimiento. Los resultados obtenidos muestran cómo esta reactivación es capaz de recuperar la capacidad de formación de esferas primarias, implicando una mayor tasa de crecimiento; y secundarias, haciendo alusión a una mayor capacidad de auto-renovación de las mismas. Este aumento en la capacidad proliferativa es un comportamiento más parejo al de neuroesferas jóvenes. Se observa además, que tanto a nivel transcripcional como de proteína, SOX9 incrementa los niveles de SOX2. En células madre de glioma (GSC) se ha descrito la existencia de una correlación entre SOX9 y SOX2, donde SOX2 regula la actividad de SOX9, abriendo la posibilidad de la existencia de un *loop* regulatorio entre ambas (Garros 2015, en revisión). En esta regulación podría estar formando parte el miR145, implicado en la regulación de los procesos de diferenciación a melanocitos, condorcitos y oligodendrocitos (Hoffmann et al. 2014; Dynoodt et al. 2012; Yang et al. 2011) de células madre a lo largo del desarrollo neural así como en GBM a través de la inactivación de SOX9. Existe una regulación recíproca entre la expresión de este miRNA y la de SOX2, por lo que es un factor a tener en cuenta a la hora de investigar acerca de la posible regulación entre los factores SOX9 y SOX2. (Hoffmann et al. 2014; Fang et al. 2011).

Durante el desarrollo del sistema nervioso central, se ha descrito que SOX2 se expresa en todas las células a lo largo de todos sus estadios, y que a partir del E11 estas células positivas

para SOX2 co-localizan con SOX9. Esta expresión de SOX9 en células previamente positivas para SOX2, son las que posteriormente dan lugar a las NSC en el tejido neural tanto en el desarrollo embrionario como en el estadio adulto (Scott et al. 2010). Nuestros resultados apoyan estos datos en un contexto de envejecimiento en el modelo con supervivencia alargada así como con el descenso de neuroesferas observado en animales envejecidos donde la reactivación de SOX9 restablece los niveles de SOX2. En cambio, los resultados observados en el modelo de envejecimiento por pases seriados en cultivo de neuroesferas procedentes de animales SOX2-GFP demuestran que bajo la presencia de una única copia de SOX2, SOX9 también es capaz restablecer dicha capacidad proliferativa que habían perdido a lo largo de los periodos de cultivo *in vitro*. Esto indica que al menos, que este “rejuvenecimiento” ejercido por SOX9 no requiere de niveles basales elevados de SOX2. También hay que tener en cuenta que una sobre-expresión de SOX2 podría desencadenar justamente lo opuesto: disminución de la proliferación y parada del ciclo celular vía p53 (Marqués-Torrejón et al. 2013).

En apoyo a esta posibilidad, en el modelo de animales Ink4/Arf/p53, se observa que el aumento del número de NSC en la SVZ de ratones envejecidos conlleva un incremento en los niveles de Sox9 y Sox2, lo que sugiere la expresión de estos podría estar ligada al envejecimiento de las NSC, ya que se correlaciona con una mayor supervivencia de estos animales.

Hasta ahora los resultados apuntan a que SOX9 puede ser un posible biomarcador de juventud y puede jugar un papel importante en el envejecimiento de las células madre neurales, pero falta por saber, entre otras cosas, cuál es el mecanismo por el que SOX9 ejerce esta función. Para ello, nos centramos en tres procesos que se han descrito estar en relación directa con el proceso del envejecimiento: estrés oxidativo, autofagia y la vía p38-MAPK.

Basándonos en trabajos recientes en los que determinan la implicación de la vía p38-MAPK en procesos de envejecimiento celular (Cosgrove et al. 2014; Li et al. 2011; Hsieh & Papaconstantinou 2002) y que a su vez, que es una vía propiamente activada por estrés (Han J, 2007; Cuenda, 2005), estudiamos la posible implicación de esta vía MAPK en el envejecimiento de las NSC.

En el año 2014, Bernet y Cosgrove determinaron que una activación constitutiva de esta vía en células madre musculares (o células satélite) disminuía su auto-renovación y capacidad regenerativa, mientras que la inhibición farmacológica parcial de la misma era suficiente para restablecer la regeneración muscular y mantener el pool de células madre en dicho tejido. Es

más, se ha descrito que p38 y p16 están en relación directa en tejidos como páncreas, músculo o pulmón, y que es el primero quien activa al segundo en situación de estrés para que la célula entre en senescencia (Bulavin et al. 2004; Yu et al. 2007; Rayess et al. 2012; Sousa-Victor et al. 2014). En nuestro caso, observamos que las NSC envejecidas presentan elevados niveles de la forma activa de p38 y que a través de la reactivación de SOX9 se induce una disminución de los mismos. Comprobamos que esta variación en los niveles de p-p38 está en concordancia con lo descrito por diferentes autores, pero esta vez en cerebro. Los resultados se validaron tras determinar que la SVZ de ratones deficientes en p38 tanto jóvenes como envejecidos presenta una mayor expresión del marcador de proliferación Ki67 así como de Sox9 y Sox2. Esto se correlaciona con una mayor capacidad de proliferación y auto-renovación de estas NSC en cultivo. A su vez, la inhibición farmacológica en neuroesferas envejecidas procedentes de ratones *wt* incrementa su capacidad de crecimiento, también asociado a un incremento significativo en la expresión de Sox9 y Sox2. Estos datos están en concordancia con trabajos implican a la vía p38-MAPK en el mantenimiento de las NSC de la SVZ en la enfermedad neurodegenerativa ataxia-telangiectasia (AT) (Kim & Wong 2012; Kim & Wong 2009). A su vez, teniendo en cuenta la relación p38-p16 descrita en páncreas, músculo y pulmón (Bulavin et al. 2004; Yu et al. 2007; Rayess et al. 2012; Sousa-Victor et al. 2014) así como la de SOX9-p16/p19 (Matheu et al. 2012), surge la posibilidad de que SOX9 pueda estar involucrada en la regulación entre los procesos de quiescencia y senescencia en el envejecimiento de las NSC.

Entre otros tipos de estrés, la vía p38-MAPK es activada por estrés oxidativo (Son et al. 2011). La teoría de los radicales libres propone que la disfunción mitocondrial progresiva que se produce a lo largo del proceso de envejecimiento tiene como resultado la producción de las denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS), que en consecuencia causan un mayor daño a nivel celular (Harman 1992). Son muchos los datos que hasta hace varios años han apoyado este papel de ROS en el proceso de envejecimiento, pero recientemente se han descrito trabajos en los que se ha replanteado esta teoría. Contrariamente a la teoría de los radicales libres, se ha observado que un incremento de ROS puede promover el alargamiento de la esperanza de vida en levaduras o *C. elegans* (Mesquita et al. 2010; Doonan et al. 2008). Además, estudios en ratones donde se aumenta el daño oxidativo no se observa un envejecimiento acelerado (Yiqiang Zhang et al. 2009) o por el contrario, un incremento en las defensas antioxidantes no parece que promueva un alargamiento en la esperanza de vida (Pérez et al. 2009). Por lo tanto, aunque hasta hace cinco años la función de ROS estaba directamente ligada a un aumento en el envejecimiento celular, hoy en día no está tan claro (López-Otín et al. 2013).

Nuestros resultados están en concordancia con la teoría clásica, ya que neuroesferas procedentes de ratones envejecidos que presentan una disminución en sus capacidades de proliferación y de auto-renovación, tratadas con un compuesto antioxidante (Trolox) muestran una reversión parcial de dicho declive y un incremento en la expresión de Sox2. Además, MEFs cultivados bajo condiciones de estrés (20% de oxígeno) expresan menores niveles de marcadores antioxidantes y a su vez, menores niveles de Sox9, mientras que los cultivados bajo condiciones menos estresantes (3% de oxígeno) mantienen elevados los niveles de marcadores antioxidantes y también los de Sox9. Esta posible asociación entre SOX9 y la expresión de genes antioxidantes se refuerza con la observación de que MEFs Z/SOX9Tg mantienen elevados los niveles de estos antioxidantes así como presentan un porcentaje menor de proteínas oxidadas en comparación con los wt. A su vez, el mantenimiento de estas características más propias de una célula “sana” por parte de los MEFs Z/SOX9Tg está ligada a su elevada capacidad proliferativa en relación con los MEFs wt (Matheu et al. 2007) y corrobora trabajos previos que asocian una mayor sensibilidad a ROS con una menor vida media celular (Parrinello et al. 2003).

En muchas ocasiones, junto con el envejecimiento y el estrés oxidativo ha sido descrito el proceso de autofagia. Este proceso es crucial para el mantenimiento de la homeostasis celular así como durante el desarrollo, y se ha determinado que alteraciones en esta, pueden dar lugar a enfermedades neurodegenerativas o incluso cáncer (He & Klionsky 2009; Mizushima & Komatsu 2011; Orenstein & Cuervo 2010; Rubinsztein et al. 2011). Al contrario que con las células somáticas, hasta hace unos años existía muy poca información acerca de la función que el proceso de autofagia tiene en las células madre, pero hoy en día ya es sabido que forma parte de su regulación. En NSC, a través de la regulación de ROS desempeña una función importante en el mantenimiento del estado quiescente y por tanto, menos diferenciado, al igual que en células madre hematopoyéticas (HSC), donde la ausencia de autofagia está asociada a una menor capacidad de auto-renovación (Guan et al. 2013; Phadwal et al. 2013; Vessoni et al. 2012; Mazumdar et al. 2010). Teniendo estos datos en cuenta, la estrecha relación entre la autofagia y el estrés oxidativo ha dado lugar a que muchos estudios se centren en determinar qué ocurre en este proceso a lo largo del envejecimiento, consensuándose hoy en día que la actividad de autofagia (todos sus tipos) disminuye a medida que las células envejecen (Rubinsztein et al. 2011b; Yen & Klionsky 2008; Salminen & Kaarniranta 2009). Particularmente, se ha descrito que gusanos y moscas transgénicas que sobreexpresan chaperonas mantienen una vida más longeva (Morrow et al. 2004; Walker & Lithgow 2003), al igual que ciertos ratones que expresan niveles elevados de las proteínas *Hsp*

(heat shock proteins) (Swindell et al. 2009). En nuestro modelo de NSC envejecidas con reactivación ectópica de SOX9 hemos observado que los niveles de Lamp2A (tanto a nivel transcripcional como traduccional), disminuyen en las NSC envejecidas pero se recuperan con la sobre-expresión de SOX9. Además, el aumento de actividad CMA en NSC procedentes de animales reporteros tras la reactivación de SOX9 da lugar a la hipótesis acerca de que SOX9 pueda estar regulando este proceso.

Ante la novedad de una posible regulación de CMA por parte de SOX9, los estudios en MEFs demuestran que el incremento en CMA por parte de SOX9 se mantiene en este modelo bajo el efecto de diferentes tipos de estrés, entre ellos el estrés oxidativo. Consistente con este dato son los elevados niveles de la proteína Lamp2a, necesaria para llevar a cabo el proceso de CMA (Majeski & Fred Dice 2004), observados en las células con elevados niveles de SOX9. En cambio, en MEFs *floxed* los niveles basales de SOX9 no parecen ser suficientes y no se observa una mayor actividad de CMA. Aunque lo esperado sería obtener una baja actividad CMA y elevada MA, los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas entre ambos tipos de autofagia. Una posible explicación consistiría en que el proceso de CMA es activado por diferentes proteínas además de SOX9 (GFAP o NFAT) que pueden estar induciendo su activación aunque los niveles de SOX9 sean bajos, por lo que en ese caso no se observaría un descenso en CMA (Bandyopadhyay et al. 2010; Cuervo et al. 2003). Otra posibilidad es que el efecto sea célula dependiente, donde el descenso en SOX9 en los MEFs SOX9^{Flox/Flox} no es tan significativo como la sobre-expresión en los SOX9Tg (Matheu et al. 2012). Mediante estudios de medición de actividad luciferasa, hemos observado que la activación de CMA por parte de SOX9 es directa, donde SOX9 regula parte de una región lejana del promotor de Lamp2a, y que esta activación aumenta en presencia de un inductor de estrés oxidativo. Para descartar la posibilidad de la existencia de un *loop* regulatorio entre SOX9 y autofagia, se determinó por una parte, que SOX9 no presenta secuencia KFERQ y además, se estudió el proceso de degradación de este factor transcripcional, observándose que SOX9 se degrada por medio del sistema proteasomal, tal y como describen otros autores (Hattori et al. 2013; Cheng & Genever 2010).

En el envejecimiento de las NSC además de Lamp2a, los niveles del marcador para MA LC3B también sufren un aumento en presencia de SOX9, lo que puede ser indicativo de que además de CMA, SOX9 pueda estar regulando MA en este modelo de NSC o que la activación de CMA pueda a su vez estar regulando MA. Aunque el mecanismo molecular por el que se regulan ambos tipos de autofagia actualmente no está del todo claro, se sabe que existe una compensación parcial entre ambas cuando una de ellas está ausente. De hecho, parece que

cuando se estimula la actividad de CMA, la MA se activa e inactiva rápidamente (Ashish C Massey et al. 2006; Kaushik et al. 2008). Se dice que dicha compensación es parcial debido a que la macroautofagia nunca va ser capaz de degradar tan específicamente proteínas como lo hace CMA, y por el contrario esta no tiene la capacidad de degradar orgánulos o nada que no sean proteínas, como lo hace la MA. Pero en cualquier caso, esta compensación es suficiente para mantener el equilibrio y el buen funcionamiento celular, y a su vez es consistente con lo observado en MEFs.

La relación entre SOX9 y CMA parece clara, donde SOX9 puede ser un novedoso candidato como regulador de este proceso tanto en MEFs como en NSC.

En cualquier caso, nuestros datos podrían estar dando una explicación adicional al efecto descrito que CMA tiene en el envejecimiento, implicando la regulación de las células madre. Con el fin de determinar el mecanismo por el que SOX9 ejerce su función en el envejecimiento de las NSC, se determinó que neuroesferas procedentes de tejido diseccionado de la SVZ de ratones deficientes en CMA (L2AckO) eran capaces de formar un menor número de estas tanto primarias como secundarias, asociándose este efecto a una menor presencia de NSC en dicho área así como a una menor capacidad de auto-renovación. En concordancia con este dato, se comprobó que tejido *ex vivo* de esta SVZ presenta a su vez una menor expresión Sox9 así como de otros marcadores asociados a célula madre, entre ellos Sox2, así como mayores niveles del biomarcador de envejecimiento p16. Estos datos apuntan a que la SVZ de ratones jóvenes deficientes en Lamp2a presenta menores características propias de célula madre y es más parecida a la SVZ de ratones *wt* envejecidos. Consistente con esto, se ha visto que el silenciamiento en hígado y otro tejidos, presentan un envejecimiento prematuro (Schneider et al. 2015).

Hasta el momento los datos parecen indicar, que con el envejecimiento de las NSC, se produce un declive en la expresión de SOX9, y con él, una reducción en la expresión de Lamp2A, disminuyendo la actividad de CMA. Además teniendo en cuenta la posible protección que ejerce SOX9 ante el efecto del estrés oxidativo, la disminución en la expresión de este con el envejecimiento induce a que la célula disponga de menores recursos antioxidantes y por tanto, presente ese fenotipo característico más envejecido y oxidado. A esto hay que sumarle que a menores niveles de SOX9, mayor activación de p38. A continuación la pregunta es, ¿existe algún tipo de regulación entre estos procesos?

Para determinar si la vía de p38-MAPK está regulando autofagia o si por el contrario, es el proceso de autofagia el que regula a esta MAPK, por un lado se han determinado los niveles de

p38 en las neuroesferas deficientes en CMA y por otro lado, se ha analizado la expresión de p38 y Lamp2A bajo tratamientos de activación e inhibición de las vías correspondientes en NSC. En conjunto, los datos demuestran que p-38 está por debajo del proceso de autofagia, y que es esta quien de alguna manera regula la activación e inhibición de esta MAPK.

La posibilidad de que p38 sea degradada por CMA fue descartada tras observar que carece de secuencia señal KFERQ así como que presenta una degradación proteasomal. Para poder encajar en este hipotético mecanismo, además de ser degradado por CMA, la proteína candidata debe activar (mediante fosforilación) a p38, de forma que a lo largo del proceso de envejecimiento el declive del proceso de autofagia permita a esta proteína permanecer activa y por tanto mantener elevados los niveles de p-p38. Las proteínas activadoras de p38-MAPK mas estudiadas son, MKP1, MKK3 y MKK6 (Enslen et al. 1998; Zhu et al. 2008; Remy et al. 2010), pero las dos primeras carecen de la secuencia señal necesaria para ser sustrato de CMA, mientras que MKK6 cuando es fosforilada en un residuo hasta ahora no descrito, adquiere dicha secuencia y abre la posibilidad de ser degradada por CMA. Es más, MEFs y NSC deficientes en CMA presentan una acumulación de MKK6, mientras que esto no se observa cuando se inhibe MA o el sistema proteasomal. El hecho de que hasta ahora esta fosforilación no haya sido descrita puede ser debido a que MKK6 es degradada tan rápido por el sistema de CMA bajo condiciones determinadas, que es muy complicado de detectarla. Esta proteína candidata sustrato de CMA sigue el mismo patrón de expresión que p-p38 en NSC envejecidas y reactivadas con SOX9, lo que nos lleva a pensar que puede ser la candidata a cerrar el mecanismo liderado por SOX9, que se desarrolla de la siguiente manera (Figura 41).

A lo largo del envejecimiento, las NSC van perdiendo los niveles de expresión de SOX9, tanto a nivel transcripcional como a nivel de proteína. Con la disminución de SOX9 se produce una reducción en la expresión de Lamp2A, induciendo un descenso en la actividad de la autofagia mediada por chaperonas (CMA). De esta forma, los sustratos que normalmente son degradados por este mecanismo comienzan a acumularse, entre ellos la proteína quinasa MKK6, encargada de activar a p38, obteniéndose como resultado la activación de esta vía.

A partir de aquí, y teniendo en cuenta el fenotipo observado en las NSC envejecidas, cabría mencionar que la activación de p38-MAPK se ha descrito previamente estar ligada a la activación del biomarcador de senescencia p16 (Bulavin et al. 2004; Yu et al. 2007). A su vez, la relación directa entre p16 y la vía de retinoblastoma (Rb) está asociada con una entrada en senescencia por parte de la célula, incluyendo en el proceso la transcripción de diferentes genes asociados con la proliferación y avance del ciclo celular, entre lo que se encuentra SOX2

Discusión

(Rayess et al. 2012; Vilas et al. 2015). Por lo que, podría resultar que SOX9 además de ser un biomarcador del envejecimiento de las NSC, su reactivación pueda estar ligada a un *bypass* de senescencia, al igual que se ha observado en células de tumores de próstata (Wang et al. 2013).



Figura 41. Representación de la disminución de SOX9 con el envejecimiento y su asociación con la disminución del número de neuroesferas.

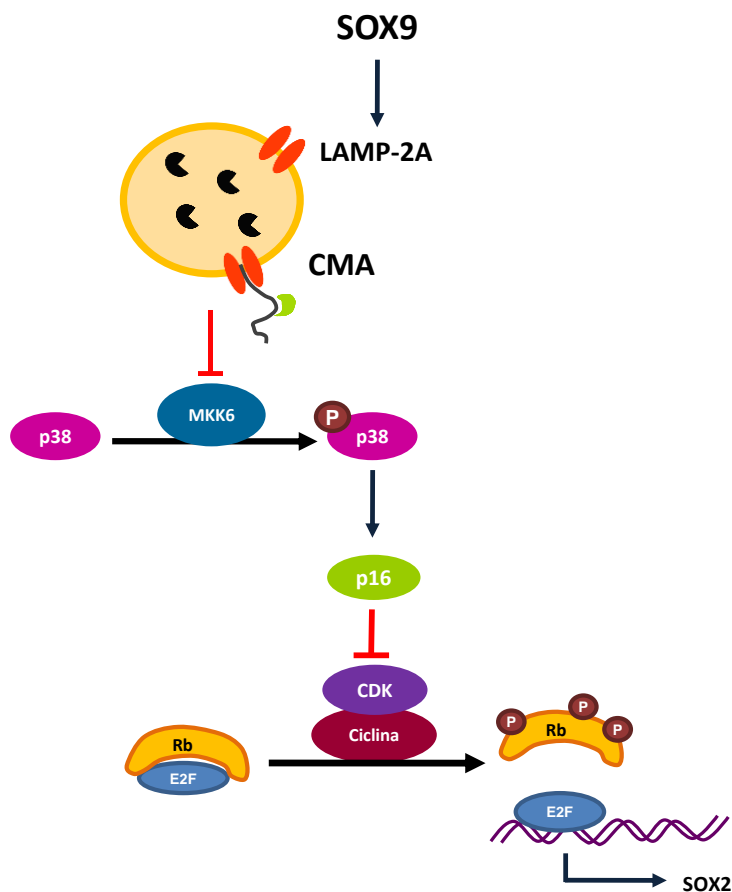


Figura 42. Representación de la vía por la que SOX9 ejerce su efecto en el envejecimiento de las NSC. En neuroesferas jóvenes, SOX9 activa la expresión de Lamp2a activando así el proceso de CMA por el que se degrada MKK6. Esta degradación implica la inactivación de p38 y en consecuencia, la inactivación de p16, lo que a su vez hace que las CDKs y ciclinas inactiven la vía Rb permitiendo que el factor transcripcional E2F transcriba la expresión de ciertos genes entre los que se encuentra SOX2.

2. MKP1 actúa como supresor tumoral en el Glioblastoma Multiforme por medio de la regulación de las *cancer stem cells*

El glioblastoma multiforme representa el glioma más agresivo en la población adulta. A pesar de los resultados de las investigaciones más recientes, el pronóstico de estos tumores permanece sombrío estando asociado a una supervivencia media de aproximadamente un año (Verhaak et al. 2010; Mitchell et al. 2005).

Gracias a los estudios de expresión génica más recientes en GBM se ha podido caracterizar parte de la actividad transcripcional presente en estos tumores, pudiendo así subdividirlos y predecir la respuesta a un tratamiento determinado (Van Meir et al. 2010). Gracias a los nuevos avances en esta caracterización a nivel genético, actualmente ya se utilizan fármacos específicos dirigidos contra dianas que juegan un papel importante en las principales rutas de señalización alteradas en los GBM, como por ejemplo el anticuerpo monoclonal bevacizumab, dirigido hacia las recurrencias de este tipo de tumores (Van Meir et al. 2010; Genentech 2009). El uso de estos fármacos ha dejado entrever la existencia de rutas compensatorias responsables de que estos fármacos específicamente dirigidos, no den lugar al índice de respuesta esperada (Wen et al. 2006). Por esta razón, las estrategias actuales han cambiado y en lugar de hacia una única diana, se están centrando en dirigir el tratamiento hacia varias al mismo tiempo, como por ejemplo la combinación de inhibidores de EGFR (mutación más frecuente), radioterapia y quimioterapia basada en temozolomida (TMZ) (Furnari et al. 2007; Van Meir et al. 2010).

Uno de los aspectos más limitantes a la hora de establecer nuevas estrategias contra el GBM es la resistencia que presentan a la terapia convencional. Una de las teorías que se postulan como responsables de esta resistencia se basa en la existencia de las denominadas *cancer stem cells* (CSC), subpoblación de células madre que se caracterizan por ser capaces de permanecer en un estado de quiescencia, haciendo que los agentes quimioterapéuticos dirigidos contra los mecanismos de división celular no sean eficaces (Singh et al. 2004; Hambardzumyan et al. 2006; Bao et al. 2006). La persistencia de estas CSC puede ayudar a explicar la recurrencia de la enfermedad. De hecho, estas CSC pueden demostrar la base de ciertas formas de latencia del glioma como la evolución de gliomas de bajo grado a los secundarios o proneurales, o también proceso mediante el cual las células tumorales persisten durante años incluso décadas tras la resección quirúrgica o radio/quimioterapia, para que repentinamente en un momento dado “despierten” y generen la enfermedad mortal. Por lo

tanto, las CSC pueden representar una doble amenaza: son más resistentes a los tratamientos terapéuticos y por ello, son capaces de regenerar el tumor una vez que la terapia ha terminado.

Teniendo en cuenta esta ineficacia en el tratamiento, el objetivo de este trabajo ha sido la identificación de nuevas dianas terapéuticas con el fin de obtener una mejor respuesta.

El factor de transcripción SOX9 es un gen crítico a lo largo del desarrollo embrionario así como en el mantenimiento de la homeostasis en varios órganos. Esta proteína juega además un papel importante en el cáncer humano dependiente de contexto: SOX9 se encuentra sobre-expresado en cánceres como colon, ovario, páncreas, próstata, pulmón y cerebro donde se le asocia con la progresión y el desarrollo del tumor (Matheu et al. 2012; Kordes & Hagel 2006). En cambio, en linfomas o en cáncer de riñón SOX9 parece no estar alterado, mientras que en melanoma, donde juega un papel como supresor tumoral, sus niveles son bajos (Passeron et al. 2009). Como se ha mencionado, SOX9 se presenta en elevados niveles en los tumores cerebrales, y recientemente en el laboratorio se ha postulado que estos están en correlación directa con los niveles de SOX2, estando ambos implicados en procesos de resistencia a Temozolamida (Garros et al 2015, en revisión).

Dado que hemos visto que SOX9 regula la vía p38-MAPK en las NSC y esta vía juega un papel relevante en GBM (Sooman et al. 2013), consideramos de interés y priorizamos el estudio en los reguladores de p38. Uno de los reguladores más establecidos de esta MAPK es MKP1, fosfatasa dual implicada en diferentes tipos de tumores por tener su expresión alterada. Así por ejemplo, sus niveles son elevados en CNMP, carcinoma de ovario o cáncer próstata (Denkert 2002; Wang et al. 2003), mientras que en carcinoma hepatocelular o testicular los niveles de esta fosfatasa están disminuidos (Chattopadhyay et al. 2006; Murty et al. 1996; Peng et al. 1999). Además, se ha asociado a MKP1 con mecanismos de resistencia a tratamientos quimioterapéuticos (Cortes-Sempere et al. 2009; Wang et al. 2007; Wang et al. 2003). En el caso de GBM, no existen estudios que impliquen a MKP1 en este tipo de tumor, y por esta razón estudiamos la expresión de esta fosfatasa en líneas de GBM con ganancia y pérdida de SOX9, obteniendo que existe una correlación inversa entre la expresión de ambas proteínas. Teniendo estos datos como referencia, se estudiaron los niveles de MKP1 partiendo de dos cohortes independientes de pacientes con tumores cerebrales de distintos grados de agresividad. La mitad de los GBM en cada cohorte presenta niveles elevados de MKP1 mientras que los tumores de menor grado presentan niveles bajos de expresión de esta fosfatasa. Estos datos adquieren más importancia cuando se determina que los pacientes que

presentan mayores niveles de MKP1 tienen mayor supervivencia: 14 y 18 meses para la cohorte de Valencia y San Sebastián respectivamente, mientras que los pacientes con niveles bajos de MKP1 presentan una supervivencia media de 9 y 6 meses para cada cohorte.

En relación a SOX9, este dato confirma la correlación inversa entre ambas proteínas: mientras elevados niveles de SOX9 se relacionan con un peor pronóstico asociado a una mayor resistencia al tratamiento, altos niveles de MKP1 están en relación directa con una mayor supervivencia del paciente.

En relación a este resultado y basándonos en el marcador de prognosis MGMT (Hegi et al. 2008), se estudió la metilación del promotor de dicha enzima en las muestras de GBM sin observarse correlación alguna entre la metilación del promotor de MGMT y la expresión de MKP1.

Con el fin de caracterizar la función de MKP1 en GBM y encontrar las diferencias por las que los pacientes con elevados niveles de esta fosfatasa sobreviven más, nos centramos en los estudios *in vitro* de líneas de GBM. Tras determinar que todas las líneas presentan niveles bajos de MKP1, se procedió a la sobre-expresión de esta en las líneas U87 y U373. Se observó que bajo elevados niveles de MKP1 el fenotipo de ambas se vuelve menos agresivo *in vitro*, pero también *in vivo* cuando en ratones inmunodeprimidos células con altos niveles de MKP1 no son capaces de formar ningún tumor, mientras que las mismas células con niveles bajos sí los forman. Este mismo resultado *in vitro* e *in vivo* sugiere que el efecto está únicamente mediado por MKP1 y no por factores microambientales que puedan estar implicados en la generación del tumor *in vivo*. En concordancia con estos datos, se observó que cuando estas células son cultivadas bajo condiciones de célula madre para el estudio de la capacidad de formación de tumoroesferas, las células con activación ectópica de MKP1 son capaces de dar lugar un número significativamente inferior de estas estructuras. Estos resultados podrían ir en la dirección de que MKP1 tiene algún tipo de función en las CSC en este tipo de tumor, al igual que se ha descrito para el cáncer de mama (Candas et al. 2014).

En respuesta a esta pregunta se comprobó que los niveles de MKP1 no solo están disminuidos en líneas CSC, sino que se incrementan de manera significativa cuando estas células entran en diferenciación. Esta expresión diferencial de MKP1 entre los distintos estados implica a esta fosfatasa en una posible regulación de las CSC en GBM.

Ensayos en líneas procedentes de biopsias de pacientes, denominadas *glioma neural stem* (GNS) (Pollard et al. 2009) se observó el mismo fenotipo: MKP1 induce una disminución en la

agresividad de estas líneas CSC. En conjunto, se observa una menor tasa de crecimiento así como una menor expresión a nivel transcripcional de genes asociados a célula madre como Sox9 y Sox2. Las dos líneas GNS además de presentar menores características propias de una línea GSC, están más diferenciadas hacia el linaje neuronal, lo cual concuerda con una menor formación de tumores *in vivo* (Gangemi et al. 2009; Matheu et al. 2012).

Todos nuestros resultados parecen indicar que MKP1 podría estar regulando las CSC en el GBM a través de la inducción de su diferenciación, y su vez que pacientes con elevados niveles de esta sobrevivan más. Según esto, MKP1 podría ser un marcador de prognosis para el paciente con GBM. En relación a estos resultados resultaría de gran interés dos tipos de abordajes para el incremento de los niveles de MKP1: por un lado el uso de un inhibidor de deacetilasas de histonas (HDAC) (Lin et al. 2015) y por otro, mediante la inhibición de γ -secretasas (Maraver et al. 2012), ambos tipos de tratamientos actualmente en ensayos clínicos en pacientes con cáncer de pulmón. Además, teniendo en cuenta que p38 es una de las dianas específicas de MKP1 (Liu et al. 2007; Boutros et al. 2008), nuestros datos están en concordancia con estudios que asocian a la activación de p38 con una peor prognosis de pacientes con GBM (Sooman et al. 2013).

Teniendo en cuenta la quimioresistencia asociada a las CSC, el hecho de que elevados niveles de MKP1 incrementen la diferenciación de estas en GBM, abre las puertas a una posible vía con el fin de incrementar la supervivencia de los pacientes (Figura 43).

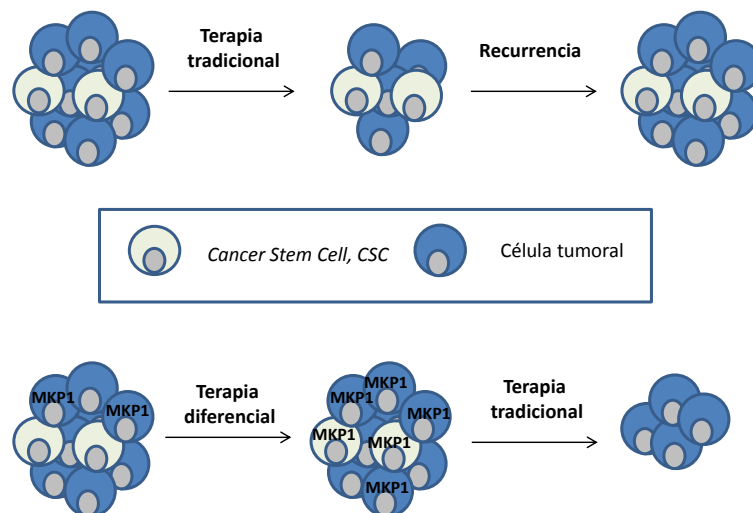
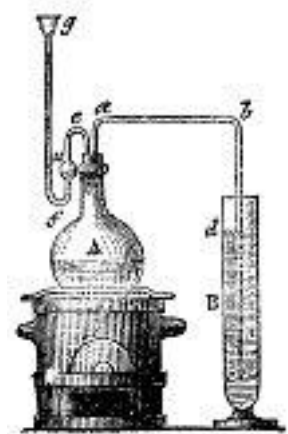


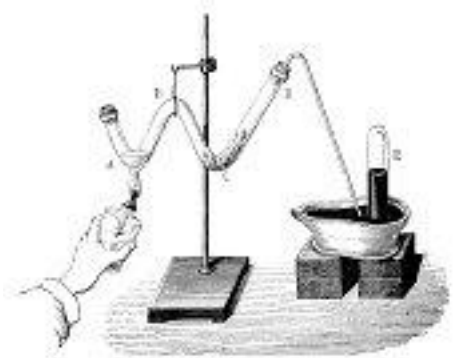
Figura 43. Posible tratamiento del glioma en función de los niveles de MKP1 y la diferenciación de las CSC.

CONCLUSIONES



1. La expresión del factor de transcripción SOX9 disminuye con el envejecimiento y esta disminución está asociada a un descenso en el número de células madre neurales, NSC, en la SVZ así como a un declive en su capacidad de proliferación y auto-renovación.
2. Ratones Ink4/Arf/p53 transgénicos con supervivencia alargada presentan un retraso en el deterioro cognitivo, un menor agotamiento de las células madre neurales, y mayor expresión de SOX9, SOX2 y otros marcadores de célula madre.
3. La reactivación ectópica de SOX9 en neuroesferas derivadas de animales viejos o envejecidos por el cultivo seriado aumenta su capacidad de crecimiento y auto-renovación además de incrementar los niveles de SOX2.
4. El “rejuvenecimiento” celular inducido por SOX9 está mediado por la reactivación de la autofagia y el silenciamiento de la vía de p38-MAPK, en este orden.
5. SOX9 es un novedoso regulador tanto de autofagia mediada por chaperonas como de la macroautofagia. En el primer caso, la activación de CMA resulta de la unión directa entre SOX9 y el promotor de Lamp2a, que ocurre en condiciones basales y aumenta en condiciones de estrés.
6. La autofagia mediada por chaperonas y p38-MAPK regulan la función de las células madre neurales y su inactivación genética y/o farmacológica reduce su número y actividad.
7. Existe una correlación inversa entre SOX9 y MKP1 en células madre de glioma.
8. Los niveles de MKP1 son bajos en células madre de glioma y aumentan cuando se induce su diferenciación en condiciones basales. Su sobre-expresión genética en dichas células reduce la capacidad proliferativa, su auto-renovación y su actividad tumoral.
9. Niveles elevados de MKP1 se observan en 50% de las biopsias de glioblastoma y esos pacientes presentan una mayor supervivencia.

CONCLUSIONS



1. The expression of the transcription factor SOX9 decreases with aging and this is associated to a decline in the number of NSC in the SVZ as well as with a decrease in their proliferation and self-renewal capacity.
2. Long-survival Ink4/Arf/p53 transgenic mice present a delayed cognitive impairment, a lower depletion of NSC, and increased expression of SOX9 , SOX2 and other stem cell markers.
3. Ectopic reactivation of SOX9 in neurospheres from old animals or aged-induced by serial cultivation increases their growth and self-renewal capacity as well as increases SOX2 expression levels.
4. The cell "rejuvenation" induced by SOX9 is mediated by the reactivation of autophagy and the silencing of p38-MAPK pathway, in this order.
5. SOX9 is a novel regulator of both CMA and MA. In the first case, CMA activation results from direct binding between the Lamp2a promoter and SOX9, occurring at baseline and increases under stress conditions.
6. Both CMA and the p38-MAPK pathway regulate the function of NSC, and their genetic and/or pharmacological inactivation reduces the number and activity.
7. There is an inverse correlation between SOX9 and MKP1 expression in glioma stem cells (GSC).
8. MKP1 levels are low in GSC and increase when differentiation is induced at baseline. The genetic over-expression in these cells reduces the proliferative capacity, self-renewal and tumor activity.
9. High levels of MKP1 observed in 50% of GBM biopsies correlate with an improved survival.

BIBLIOGRAFÍA



- Ahlenius, H. et al., 2009. Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(14), pp.4408–4419.
- Akiyama, H., 2006. Sox family regulate chondrogenesis. *Clinical calcium*, 16(2), pp.368–372.
- Alonso, A. et al., 2004. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, 117(6), pp.699–711.
- Alonso, A. et al., 2004. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, 117(6), pp.699–711.
- Alvarez-Buylla, A. et al., 2008. The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. pp. 357–365.
- Aoki, Y. et al., 2008. The RAS/MAPK syndromes: Novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Human Mutation*, 29(8), pp.992–1006.
- Arnold, K. et al., 2011. Sox2 + adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell Stem Cell*, 9(4), pp.317–329.
- Avilion, A.A. et al., 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes and Development*, 17(1), pp.126–140.
- Bandyopadhyay, U. et al., 2010. Identification of Regulators of Chaperone-Mediated Autophagy. *Molecular Cell*, 39(4), pp.535–547.
- Bao, S. et al., 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444(7120), pp.756–760.
- Bear, M.F., Connors, B.W. & Paradiso, M.A., 2007. Neuroscience: Past, Present, and Future. In *Neuroscience*. pp. 4–14.
- Bergamini, E., 2005. Targets for antiageing drugs. *Expert opinion on therapeutic targets*, 9(1), pp.77–82.
- Bernet, J.D. et al., 2014. p38 MAPK signaling underlies a cell-autonomous loss of stem cell self-renewal in skeletal muscle of aged mice. *Nature medicine*, 20(3), pp.265–71.
- Bjedov, I. et al., 2010. Mechanisms of Life Span Extension by Rapamycin in the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metabolism*, 11(1), pp.35–46.
- Blagosklonny, M. V., 2008. Aging: ROS or TOR. *Cell Cycle*, 7(21), pp.3344–3354.
- Blagosklonny, M. V., 2011. Rapamycin-induced glucose intolerance: Hunger or starvation diabetes. *Cell Cycle*, 10(24), pp.4217–4224.
- Bleau, A.M. et al., 2009. PTEN/PI3K/Akt Pathway Regulates the Side Population Phenotype and ABCG2 Activity in Glioma Tumor Stem-like Cells. *Cell Stem Cell*, 4(3), pp.226–235.

- Bonfanti, P., Barrandon, Y. & Cossu, G., 2012. "Hearts and bones": the ups and downs of "plasticity" in stem cell biology. *EMBO molecular medicine*, 4(5), pp.353–61.
- Botti, J. et al., 2006. Autophagy signaling and the cogwheels of cancer. *Autophagy*, 2(2), pp.67–73.
- Bouab, M. et al., 2011. Aging of the subventricular zone neural stem cell niche: Evidence for quiescence-associated changes between early and mid-adulthood. *Neuroscience*, 173, pp.135–149.
- Boutros, T., Chevet, E. & Metrakos, P., 2008. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacological reviews*, 60(3), pp.261–310.
- Brazel, C.Y. et al., 2005. Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell*, 4(4), pp.197–207.
- Brennan, C. et al., 2009. Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS ONE*, 4(11).
- Brennan, C.W.W. et al., 2013. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell*, 155(2), pp.462–477.
- Brien, P. et al., 2013. p38 α MAPK regulates adult muscle stem cell fate by restricting progenitor proliferation during postnatal growth and repair. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 31(8), pp.1597–610.
- Bulavin, D. V et al., 2004. Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nature genetics*, 36(4), pp.343–50.
- Candas, D. et al., 2014. Mitochondrial MKP1 is a target for therapy-resistant HER2-positive breast cancer cells. *Cancer Res*, 74(24), pp.7498–7509.
- Castillo, S.D. & Sanchez-Cespedes, M., 2012. The SOX family of genes in cancer development: biological relevance and opportunities for therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*, 16(9), pp.903–19.
- Chattopadhyay, S. et al., 2006. MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*, 25(23), pp.3335–3345.
- Chen, Y. et al., 2008. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death and Differentiation*, 15(1), pp.171–182.
- Cheng, A. & Genever, P.G., 2010. SOX9 determines RUNX2 transactivity by directing intracellular degradation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(12), pp.2404–2413.
- Conboy, M.J., Conboy, I.M. & Rando, T. a, 2013. Heterochronic parabiosis: historical perspective and methodological considerations for studies of aging and longevity. *Aging cell*, 12(3), pp.525–30.
- Cortes-Sempere, M. et al., 2009. MKP1 repression is required for the chemosensitizing effects

- of NF- κ B and PI3K inhibitors to cisplatin in non-small cell lung cancer. *Cancer Letters*, 286(2), pp.206–216.
- Cosgrove, B.D. et al., 2014. Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles. *Nature medicine*, 20(3), pp.255–64.
- Cuenda, A. & Rousseau, S., 2007. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et biophysica acta*, 1773(8), pp.1358–1375.
- Cuervo, A.M. et al., 2003. Cathepsin a regulates chaperone-mediated autophagy through cleavage of the lysosomal receptor. *EMBO Journal*, 22(1), pp.47–59.
- Davis, T. et al., 2005. Prevention of accelerated cell aging in Werner syndrome using a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 60(11), pp.1386–1393.
- Dhillon, A.S. et al., 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26(22), pp.3279–3290.
- Dickinson, R.J. & Keyse, S.M., 2006. Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *Journal of cell science*, 119(Pt 22), pp.4607–4615.
- Dimri, G.P. et al., 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), pp.9363–9367.
- Dingli, D., Traulsen, A. & Pacheco, J.M., 2007. Stochastic dynamics of hematopoietic tumor stem cells. *Cell Cycle*, 6(February 2015), pp.461–466.
- Doetsch, F. et al., 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97(6), pp.703–716.
- Dontu, G. et al., 2004. Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast cancer research : BCR*, 6(6), pp.R605–R615.
- Doonan, R. et al., 2008. Against the oxidative damage theory of aging: Superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes and Development*, 22(23), pp.3236–3241.
- Dreskin, S.C. et al., 2001. Isoforms of Jun kinase are differentially expressed and activated in human monocyte/macrophage (THP-1) cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(9), pp.5646–5653.
- Driessens, G. & Blanpain, C., 2011. Long live Sox2: Sox2 lasts a lifetime. *Cell Stem Cell*, 9(4), pp.283–284.
- Dynoodt, P. et al., 2012. Identification of miR-145 as a Key Regulator of the Pigmentary Process. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(1), pp.201–209.
- Ellis, P. et al., 2004. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Developmental Neuroscience*, 26(2-4),

pp.148–165.

- Engel, F.B. et al., 2005. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes and Development*, 19(10), pp.1175–1187.
- Enslen, H., Raingeaud, J. & Davis, R.J., 1998. Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *The Journal of biological chemistry*, 273(3), pp.1741–1748.
- Fang, X. et al., 2011. The SOX2 response program in glioblastoma multiforme: an integrated ChIP-seq, expression microarray, and microRNA analysis. *BMC genomics*, 12(1), p.11.
- Finkel, T. & Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), pp.239–247.
- Flores, I. & Blasco, M. a., 2010. The role of telomeres and telomerase in stem cell aging. *FEBS Letters*, 584(17), pp.3826–3830.
- Furnari, F.B. et al., 2007. Malignant astrocytic glioma: Genetics, biology, and paths to treatment. *Genes and Development*, 21(21), pp.2683–2710.
- Furuyama, K. et al., 2011. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nature genetics*, 43(1), pp.34–41.
- Gangemi, R.M.R. et al., 2009. SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem cells*, 27(1), pp.40–48.
- Gems, D. & Partridge, L., 2013. Genetics of longevity in model organisms: debates and paradigm shifts. *Annual review of physiology*, 75, pp.621–44.
- Genentech, I., 2009. AVASTIN® (bevacizumab). *Cell*, 44, pp.1–25.
- Gómez-Gaviro, M.V. et al., 2012. Betacellulin promotes cell proliferation in the neural stem cell niche and stimulates neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), pp.1317–22.
- Gruber, R. et al., 2006. Fracture healing in the elderly patient. *Experimental Gerontology*, 41(11), pp.1080–1093.
- Guan, J.L. et al., 2013. Autophagy in stem cells. *Autophagy*, 9(6), pp.830–849.
- Guo, W. et al., 2012. Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell*, 148(5), pp.1015–1028.
- Hambardzumyan, D. et al., 2006. Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors. *Cancer cell*, 10(6), pp.454–6.
- Hambardzumyan, D., Becher, O.J. & Holland, E.C., 2008. Cancer stem cells and survival pathways. *Cell Cycle*, 7(10), pp.1371–1378.
- Han, J. & Sun, P., 2007. The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(8), pp.364–371.

- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674.
- Hara, T. et al., 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441(7095), pp.885–889.
- Harman, D., 1992. Free radical theory of aging. *Mutation Research/DNAging*, 275(3-6), pp.257–266.
- Harrison, D.E. et al., 2009. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 460(7253), pp.392–5.
- Hattori, T. et al., 2013. E6-AP/UBE3A protein acts as a ubiquitin ligase toward SOX9 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 288(49), pp.35138–35148.
- He, C. & Klionsky, D.J., 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics*, 43, pp.67–93.
- Hegi, M.E. et al., 2008. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *Journal of Clinical Oncology*, 26(25), pp.4189–4199.
- Hekimi, S., Lapointe, J. & Wen, Y., 2011. Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends in Cell Biology*, 21(10), pp.569–576.
- Hoffmann, S.A. et al., 2014. Stem cell factor Sox2 and its close relative Sox3 have differentiation functions in oligodendrocytes. *Development (Cambridge, England)*, 141(1), pp.39–50.
- Hou, L.C. et al., 2006. Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options. *Neurosurgical focus*, 20(4), p.E5.
- Hsieh, C.C. & Papaconstantinou, J., 2002. The effect of aging on p38 signaling pathway activity in the mouse liver and in response to ROS generated by 3-nitropropionic acid. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123(11), pp.1423–1435.
- Hutton, S.R. & Pevny, L.H., 2010. Sox Gene Expression. In *Encyclopedia of Neuroscience*. pp. 145–151.
- Ito, K. et al., 2004. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 431(7011), pp.997–1002.
- Jackson, E.L. et al., 2006. PDGFR α -Positive B Cells Are Neural Stem Cells in the Adult SVZ that Form Glioma-like Growths in Response to Increased PDGF Signaling. *Neuron*, 51(2), pp.187–199.
- Jaenisch, R. & Young, R., 2008. Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Cell*, 132(4), pp.567–582.
- Janzen, V. et al., 2006. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*, 443(7110), pp.421–426.

- Jones, N.C. et al., 2005. The p38alpha/beta MAPK functions as a molecular switch to activate the quiescent satellite cell. *The Journal of cell biology*, 169(1), pp.105–16.
- Kaufman, D.S., 2010. HIF hits Wnt in the stem cell niche. *Nature cell biology*, 12(10), pp.926–927.
- Kaushik, S. et al., 2008. Constitutive activation of chaperone-mediated autophagy in cells with impaired macroautophagy. *Mol Biol Cell*, 19(5), pp.2179–2192.
- Keyse, S.M., 2008. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 27(2), pp.253–261.
- Kippin, T.E., Martens, D.J. & Van Der Kooy, D., 2005. p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes and Development*, 19(6), pp.756–767.
- Klionsky, D.J., 2007. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(11), pp.931–937.
- Koga, H. et al., 2011. A photoconvertible fluorescent reporter to track chaperone-mediated autophagy. *Nature communications*, 2, p.386.
- Komatsu, M. et al., 2005. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *Journal of Cell Biology*, 169(3), pp.425–434.
- Komatsu, M. et al., 2006. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 441(7095), pp.880–884.
- Kondoh, K. & Nishida, E., 2007. Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(8), pp.1227–1237.
- Kordes, U. & Hagel, C., 2006. Expression of SOX9 and SOX10 in central neuroepithelial tumor. *Journal of Neuro-Oncology*, 80, pp.151–155.
- de la Rocha, A.M.A. et al., 2014. Role of SOX family of transcription factors in central nervous system tumors. *American journal of cancer research*, 4(4), pp.312–24.
- Li, Z. et al., 2011. Age-induced augmentation of p38 MAPK phosphorylation in mouse lung. *Experimental Gerontology*, 46(8), pp.694–702.
- Liew, C.-G. et al., 2005. Human embryonic stem cells: possibilities for human cell transplantation. *Annals of medicine*, 37(7), pp.521–532.
- Lilienbaum, A., 2013. Relationship between the proteasomal system and autophagy. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 4(1), pp.1–26.
- Lin, Y.-C. et al., 2015. DUSP1 Expression Induced by HDAC1 Inhibition Mediates Gefitinib Sensitivity in Non-Small Cell Lung Cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21(2), pp.428–38.
- Liu, S. et al., 2006. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Research*, 66(12), pp.6063–6071.

- Liu, Y., Shepherd, E.G. & Nelin, L.D., 2007. MAPK phosphatases--regulating the immune response. *Nature reviews. Immunology*, 7(3), pp.202–212.
- López-Otín, C. et al., 2013. The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), pp.1194–217.
- Losa, J.H. et al., 2003. Role of the p38 MAPK pathway in cisplatin-based therapy. *Oncogene*, 22(26), pp.3998–4006.
- Louis, D.N. et al., 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 114(2), pp.97–109.
- Lugert, S. et al., 2010. Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell*, 6(5), pp.445–456.
- Luo, J. et al., 2006. The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell*, 5(2), pp.139–152.
- Madeo, F., Tavernarakis, N. & Kroemer, G., 2010. Can autophagy promote longevity? *Nature cell biology*, 12(9), pp.842–846.
- Maraver, A. et al., 2012. Therapeutic effect of gamma-secretase inhibition in KrasG12V-driven non-small cell lung carcinoma by derepression of DUSP1 and inhibition of ERK. *Cancer Cell*, 22(2), pp.222–234.
- Marmor, M.D., Skaria, K.B. & Yarden, Y., 2004. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. In *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. pp. 903–913.
- Marqués-Torrejón, M.Á. et al., 2013. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21 Controls Adult Neural Stem Cell Expansion by Regulating Sox2 Gene Expression. *Cell Stem Cell*, 12(1), pp.88–100.
- Maslov, A.Y. et al., 2004. Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J Neurosci*, 24(7), pp.1726–1733.
- Massey, A.C. et al., 2006. Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(15), pp.5805–5810.
- Massey, A.C., Zhang, C. & Cuervo, A.M., 2006. Chaperone-Mediated Autophagy in Aging and Disease. *Current Topics in Developmental Biology*, 73, pp.205–235.
- Matheu, A. et al., 2007. Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature*, 448(7151), pp.375–379.
- Matheu, A. et al., 2012. Oncogenicity of the developmental transcription factor Sox9. *Cancer Research*, 72(5), pp.1301–1315.
- Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V. & White, E., 2007. Role of autophagy in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 7(12), pp.961–967.
- Mazumdar, J. et al., 2010. O2 regulates stem cells through Wnt/ β -catenin signalling. *Nature*

- cell biology*, 12(10), pp.1007–1013.
- Van Meir, E.G. et al., 2010. Exciting New Advances in Neuro-Oncology. *CA: a cancer journal for clinicians*, 60, pp.166–193.
- Mesquita, A. et al., 2010. Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H₂O₂ and superoxide dismutase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(34), pp.15123–15128.
- Mitalipov, S. & Wolf, D., 2009. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 114, pp.185–199.
- Mitchell, P., Ellison, D.W. & Mendelow, a D., 2005. Surgery for malignant gliomas: mechanistic reasoning and slippery statistics. *The Lancet. Neurology*, 4(7), pp.413–22.
- Mizushima, N., 2004. Methods for monitoring autophagy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(12), pp.2491–2502.
- Mizushima, N. & Klionsky, D.J., 2007. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annual review of nutrition*, 27, pp.19–40.
- Mizushima, N. & Komatsu, M., 2011. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell*, 147(4), pp.728–741.
- Molofsky, A. V et al., 2006. Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature*, 443(7110), pp.448–452.
- Murty, V. V et al., 1996. Deletion mapping identifies loss of heterozygosity at 5p15.1-15.2, 5q11 and 5q34-35 in human male germ cell tumors. *Oncogene*, 12(12), pp.2719–2723.
- Nakahata, T., Gross, a J. & Ogawa, M., 1982. A stochastic model of self-renewal and commitment to differentiation of the primitive hemopoietic stem cells in culture. *Journal of cellular physiology*, 113(3), pp.455–458.
- Nakatogawa, H. et al., 2009. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(7), pp.458–467.
- Naor, Z., Benard, O. & Seger, R., 2000. Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: The case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 11(3), pp.91–99.
- Ogata, M. et al., 2006. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Molecular and cellular biology*, 26(24), pp.9220–9231.
- Ohgaki, H., 2009. Epidemiology of brain tumors. *Methods in Molecular Biology*, 472, pp.323–342.
- Orenstein, S.J. & Cuervo, A.M., 2010. Chaperone-mediated autophagy: Molecular mechanisms and physiological relevance. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 21(7), pp.719–726.

- Owens, D.M. & Keyse, S.M., 2007. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*, 26(22), pp.3203–3213.
- Parrinello, S. et al., 2003. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nature cell biology*, 5(8), pp.741–747.
- Passeron, T. et al., 2009. Upregulation of SOX9 inhibits the growth of human and mouse melanomas and restores their sensitivity to retinoic acid. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(4), pp.954–963.
- Peng, H.Q. et al., 1999. Chromosomal deletions occur in restricted regions of 5q in testicular germ cell cancer. *Oncogene*, 18(21), pp.3277–3283.
- Pérez, V.I. et al., 2009. The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Aging cell*, 8(1), pp.73–5.
- Pevny, L.H. & Nicolis, S.K., 2010. Sox2 roles in neural stem cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(3), pp.421–424.
- Phadwal, K., Watson, A.S. & Simon, A.K., 2013. Tightrope act: Autophagy in stem cell renewal, differentiation, proliferation, and aging. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(1), pp.89–103.
- Pollard, S.M. et al., 2009. Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell stem cell*, 4(6), pp.568–580.
- Powers, E.T. et al., 2009. Biological and Chemical Approaches to Diseases of Proteostasis Deficiency. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), pp.959–991.
- Prigione, A. et al., 2010. The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 28(4), pp.721–733.
- Pritchett, J. et al., 2011. Understanding the role of SOX9 in acquired diseases: Lessons from development. *Trends in Molecular Medicine*, 17(3), pp.166–174.
- Qu, X. et al., 2003. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), pp.1809–1820.
- Rayess, H., Wang, M.B. & Srivatsan, E.S., 2012. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 130(8), pp.1715–25.
- Remy, G. et al., 2010. Differential activation of p38MAPK isoforms by MKK6 and MKK3. *Cellular Signalling*, 22(4), pp.660–667.
- Rera, M. et al., 2011. Modulation of longevity and tissue homeostasis by the Drosophila PGC-1 homolog. *Cell metabolism*, 14(5), pp.623–34.
- Reya, T. et al., 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), pp.105–11.
- Richard Morris., M.F., 2003. La ciencia del cerebro una introduccion para jovenes estudiantes. *La Asociación Británica de Neurociencias*.

- Rodriguez, A.M. et al., 2005. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. In *Biochimie*. pp. 125–128.
- Rossi, D.J. et al., 2007. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*, 447(7145), pp.725–729.
- Rubinsztein, D.C., Mariño, G. & Kroemer, G., 2011. Autophagy and aging. *Cell*, 146(5), pp.682–695.
- Sanchez-Perez, I. et al., 2000. CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene*, 19(45), pp.5142–5152.
- Sarkar, A. & Hochedlinger, K., 2013. The Sox family of transcription factors: Versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell*, 12(1), pp.15–30.
- Schneider, J.L. et al., 2015. Loss of hepatic chaperone-mediated autophagy accelerates proteostasis failure in aging. *Aging Cell*, 14(2), pp.249–264.
- Scott, C.E. et al., 2010. SOX9 induces and maintains neural stem cells. *Nature neuroscience*, 13(10), pp.1181–1189.
- Singh, S.K. et al., 2004. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*, 23(43), pp.7267–73.
- Sohal, R.S. & Weindruch, R., 1996. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5271), pp.59–63.
- Son, Y. et al., 2011. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *Journal of signal transduction*, 2011, p.792639.
- Sooman, L. et al., 2013. Vandetanib combined with a p38 MAPK inhibitor synergistically reduces glioblastoma cell survival. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 30(3), p.638.
- St John, J.C. et al., 2006. The analysis of mitochondria and mitochondrial DNA in human embryonic stem cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 331, pp.347–74.
- Stolt, C.C. et al., 2003. The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes & development*, 17(13), pp.1677–89.
- Stupp, R. et al., 2009. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology*, 10(5), pp.459–466.
- Stupp, R. et al., 2002. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *Journal of Clinical Oncology*, 20(5), pp.1375–1382.
- Suh, H. et al., 2007. In Vivo Fate Analysis Reveals the Multipotent and Self-Renewal Capacities of Sox2+ Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Cell Stem Cell*, 1(5), pp.515–528.
- Swartling, F.J. et al., 2012. Distinct Neural Stem Cell Populations Give Rise to Disparate Brain

- Tumors in Response to N-MYC. *Cancer Cell*, 21(5), pp.601–613.
- Tanaka, Y. et al., 2000. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*, 406(6798), pp.902–906.
- Taupin, P., 2006. The therapeutic potential of adult neural stem cells. *Curr Opin Mol Ther*, 8(3), pp.225–231.
- Theodosiou, A. et al., 2002. MAP kinase phosphatases. *Genome biology*, 3(7), p.REVIEWS3009.
- Todde, V., Veenhuis, M. & van der Klei, I.J., 2009. Autophagy: Principles and significance in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1792(1), pp.3–13.
- Valdor, R. et al., 2014. Chaperone-mediated autophagy regulates T cell responses through targeted degradation of negative regulators of T cell activation. *Nature immunology*, 15(11), pp.1–11.
- Ventura, J.J. et al., 2007. p38 α MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nature Genetics*, 39(6), pp.750–758.
- Verhaak, R.G.W. et al., 2010. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17(1), pp.98–110.
- Vessoni, A.T., Muotri, A.R. & Okamoto, O.K., 2012. Autophagy in Stem Cell Maintenance and Differentiation. *Stem Cells and Development*, 21(4), pp.513–520.
- Vijg, J. & Campisi, J., 2008. Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature*, 454(7208), pp.1065–1071.
- Vilas, J.M. et al., 2015. Transcriptional regulation of Sox2 by the retinoblastoma family of pocket proteins. *Oncotarget*, 6(5), pp.2992–3002.
- Wagner, W. et al., 2008. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: A continuous and organized process. *PLoS ONE*, 3(5).
- Wang, G. et al., 2013. Zbtb7a suppresses prostate cancer through repression of a Sox9-dependent pathway for cellular senescence bypass and tumor invasion. *Nature genetics*, 45(7), pp.739–46.
- Wang, H.Y., Cheng, Z. & Malbon, C.C., 2003. Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer. *Cancer Letters*, 191(2), pp.229–237.
- Wang, J., Zhou, J.-Y. & Wu, G.S., 2007. ERK-dependent MKP-1-mediated cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. *Cancer research*, 67(24), pp.11933–11941.
- Wang, Z. et al., 2006. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is required for cisplatin resistance. *Cancer Research*, 66(17), pp.8870–8877.
- Wegner, M., 2005. Secrets to a healthy Sox life: Lessons for melanocytes. *Pigment Cell*

- Research*, 18(2), pp.74–85.
- Welstead, G.G., Brambrink, T. & Jaenisch, R., 2008. Generating iPS cells from MEFS through forced expression of Sox-2, Oct-4, c-Myc, and Klf4. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (14).
- Wen, P.Y., Kesari, S. & Drappatz, J., 2006. Malignant gliomas: strategies to increase the effectiveness of targeted molecular treatment. *Expert review of anticancer therapy*, 6(5), pp.733–754.
- Wilkinson, J.E. et al., 2012. Rapamycin slows aging in mice. *Aging cell*, 11(4), pp.675–82.
- Wojtowicz, J.M. & Kee, N., 2006. BrdU assay for neurogenesis in rodents. *Nature protocols*, 1(3), pp.1399–1405.
- Wong, E. & Cuervo, A.M., 2010. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nature neuroscience*, 13(7), pp.805–811.
- Wong, E.S.M. et al., 2009. p38MAPK Controls Expression of Multiple Cell Cycle Inhibitors and Islet Proliferation with Advancing Age. *Developmental Cell*, 17(1), pp.142–149.
- Wright, L.S. et al., 2006. Human progenitor cells isolated from the developing cortex undergo decreased neurogenesis and eventual senescence following expansion in vitro. *Experimental cell research*, 312(11), pp.2107–20.
- Wu, G.S., 2007. Role of mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs) in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(3-4), pp.579–585.
- Yamanaka, S., 2007. Strategies and New Developments in the Generation of Patient-Specific Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 1(1), pp.39–49.
- Yang, B. et al., 2011. MicroRNA-145 regulates chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells by targeting Sox9. *PLoS One*, 6(7), p.e21679.
- Yorimitsu, T. & Klionsky, D.J., 2005. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell death and differentiation*, 12 Suppl 2, pp.1542–1552.
- Yu, E. et al., 2007. Overexpression of the wip1 gene abrogates the p38 MAPK/p53/Wip1 pathway and silences p16 expression in human breast cancers. *Breast cancer research and treatment*, 101(3), pp.269–78.
- Yue, Z. et al., 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), pp.15077–15082.
- Zhang, C. & Cuervo, A.M., 2008. Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. *Nature medicine*, 14(9), pp.959–965.
- Zhang, Y. et al., 2009. Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(47), pp.19860–19865.

- Zhang, Y. et al., 2009. Mice deficient in both Mn superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 have increased oxidative damage and a greater incidence of pathology but no reduction in longevity. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 64(12), pp.1212–20.
- Zhu, X. et al., 2008. Activation of MKK6, an upstream activator of p38, in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 79(2), pp.311–318.

ANEXO I

Artículos publicados durante la tesis

Anexo II

Curriculum Vitae

CURRICULUM VITAE

Olatz Arrizabalaga Garde

Información personal

Fecha de nacimiento: 9 de Febrero, 1987 **Lugar de nacimiento:** San Sebastián, Guipúzcoa

Dirección: Carlos I 16 3E 20011 San Sebastián, Guipúzcoa

Teléfono: 945 21 11 11 **e-mail:** olatzarrizabalaga@gmail.com

olatz.arrizabalaga@biodonostia.org

oagarde@iib.uam.es

Educación

Institución	Título	Año
Universidad de León	Licenciada en Biotecnología	2010
University of New Haven, CT, USA	Máster in Cell&Molecular Biology	2011
Universidad Autónoma de Madrid	Doctorado en Biociencias moleculares	2015
AENOR-Universidad Rey Juan Carlos	Máster en Gestión de la Innovación	2015/2016

Carrera Profesional

2008	Prácticas en la Unidad Experimental del Hospital Donostia, Guipúzcoa
2009/10	Becario en investigación, Department of Science, Stony Brook University (NY, USA) y Universidad de León, España.
2011	Contrato en investigación en el Hospital La Paz y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC, Madrid, España
2011/15	Beca Predoctoral del Gobierno Vasco , España. Doctorado realizado en el Instituto de Invesitgaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC, Madrid y el Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia, San Sebastián. Doctorado por la Universidad Autónoma de Madrid, fecha de lectura de tesis 11/12/2015.

2015 Beca del Gobierno Vasco para la realización de una estancia predoctoral en el laboratorio de la Dra. Ana María Cuervo en **Albert Einstein College of Medicine**, New York, USA.

Idiomas

Inglés
Euskera

Informática

Microsoft Office, Perl, WordPress, EndNote, GraphPad

Otros

2012 Curso de experimentación con **animales**, Categoría B, Animalaria, España

2012 Curso básico de manipulación con agentes **radioactivos**, CSIC, Spain

Premios y Experiencia Internacional

Diputación de Guipúzcoa, España, 1999-2001

Estancias temporales en Weymouth (1999, UK), Bath (2000, UK) and Brighton (2001, UK) para mejora del inglés.

Diputación de Guipúzcoa, España, 2001

Beca para el intercambio de estudiantes. Estancia realizada en Berlin, Alemania.

Universidad de León, España, 2009

Beca para la realización de una estancia de un curso en Stony Brook University, NY, USA para la finalización de la carrera de Biotecnología.

Bancaja, España, 2009

Beca para la realización de una estancia de un curso en Stony Brook University, NY, USA para la finalización de la carrera de Biotecnología.

Kutxa, España, 2009

Beca para la realización de una estancia de un curso en Stony Brook University, NY, USA para la finalización de la carrera de Biotecnología

Gobierno Vasco, España, 2011

Beca Predoctoral. Directores de tesis Dra. Rosario Perona (Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC) y el Dr. Ander Matheu (Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia).

Gobierno Vasco, España, 2015

Beca del Gobierno Vasco para la realización de una estancia corta predoctoral en el Albert Einstein College of Medicine, New York, USA

Departamento de Salud del Gobierno Vasco

Beca para la formación de profesional del ámbito biosanitario (pendiente de resolución)

Cursos y congresos

2015 II International Symposium on Clinical and Basic Investigation in Glioblastoma, Toledo, España

“SOX2 regulates glioma stem cell activity and temozolomide resistance through SOX9”. **Arrizabalaga O.**, Moreno L, Garros L., Puga M., Ruiz I., Sampron N., Villanua J, Matheu A.

2014 RefBio Collaborative Workshop, Logroño, España

2014 Curso de verano U. País Vasco, Envejecimiento Saludable, San Sebastián, España

2014 Life Technologies training course on Ion Torrent NGS Bioinformatics, San Sebastián, España

2013 14th ASEICA International Congress, Madrid, España.

“Sox9 function in cancer”. Carrasco E., Aldaz P., **Arrizabalaga O.**, Garros L., Matheu A.

2013 American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting. Chicago, USA

“Insulin analogues do not stimulate cell growth in human cancer initiating cells (CICs)”. Holgado E., Cortes Sempere M., Pernia O., **Arrizabalaga O.**, Ibañez de Cáceres I., Hitt R., De Castro J., Ayuso Sacido A., Perona R., Belda-Iniesta C.

2012 Curso de experimentación animal, categoría B. Animalaria, España

2012 Curso básico de manipulación con agentes **radioactivos**, CSIC, España

2012 1st International Symposium on Personalized Medicine. Centro Nacional de Investigación del Cáncer (CNIO), Madrid, España

- 2012 Curso sobre la Investigación y la Innovación en el campo de la medicina. Universidad del País Vasco, España
- 2011 Workshop about Oxidative Stress, Senescence and DNA damage. Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-UAM, Madrid, España
- 2009 IV Congreso Interuniversitario de Biotecnología, Valencia, España
- 2008 Distrofia muscular: la función de la Calpaína3. Universidad de País Vasco, España
- 2008 III Congreso Interuniversitario de Biotecnología, León, España (Organizadora)
- 2009 Biotechnology and Business, Salamanca, España
- 2007 IV Congreso Interuniversitario de Biotecnología, Sevilla, España

Publicaciones

Arrizabalaga O*, Garros-Regulez L*, Aldaz P*., Garcia I., Manterola L., Carrasco-Garcia E., Villanua J., Ruiz I., Pollard S., Sampron N., Matheu A. SOX2 regulates glioma stem cell activity and temozolomide resistance through SOX9. Expert Opinion on Therapeutic Targets (Under revision).

*This authors contribute equally and should be considered as first authors

Carrasco E, **Arrizabalaga O**, Serrano M, Lovell-Badge R, Matheu A. Increased gene dosage of Ink4/Arf and p53 delays age-associated central nervous system functional decline. Aging Cell, 2015.

Carrasco E, Sampron N, Aldaz P, **Arrizabalaga O**, Villanua J, Barrena C, Ruiz I, Arrazola M, Lawrie C, Matheu A. Therapeutic Strategies Targeting Glioblastoma Stem Cells. Topics in Anti-Cancer Research e-book. Chapter 15, 2014.

Carrasco-Garcia E, Sampron N, Aldaz P, **Arrizabalaga O**, Villanua J, Barrena C, Ruiz I, Arrazola M, Lawrie C, Matheu A. Therapeutic Strategies Targeting Glioblastoma Stem Cells. Recent Pat Anticancer Drug Discov. 13;8(3):216-27. 2013